

Isabel Maria Lopes Pereira Carlos Peres

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO E
HISTOPATOLÓGICO DOS EFEITOS DO COBRE NA CARPA
(*Cyprinus carpio L.*)**

Dissertação apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Ciências do Ambiente,
Especialidade Poluição e Tensões
Ambientais, pela Universidade Nova de
Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

LISBOA
1991

nº arquivo
"copyright"

Aos meus Pais

Ao André

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Jean-Claude Pihan, agradeço a orientação desta dissertação, cujas sugestões e discussões muito contribuíram para a sua elaboração. Que ele encontre aqui a expressão do meu reconhecimento.

Ao Professor Doutor Rui Ganho desejo agradecer muito sinceramente a atenção que este trabalho lhe mereceu, não só pelas sugestões e constante incentivo à sua realização, mas também por se ter disponibilizado para estabelecer a ligação entre o orientador da dissertação e o Conselho Científico.

Desejo também agradecer ao Professor Doutor José Filipe dos Santos Oliveira com quem iniciei este trabalho, o apoio e incentivo que sempre me demonstrou.

À Professora Doutora Maria José Costa agradeço o interesse demonstrado pelo trabalho e as suas muito úteis sugestões.

Uma palavra de agradecimento é ainda devida à Professora Doutora Maria de Lourdes Gonçalves pela disponibilidade para discutir alguns aspectos desta dissertação.

Ao Laboratório de Ecologia da Universidade de Metz agradeço o acolhimento durante os estágios que ali realizei, bem como as frutuosas discussões sobre o trabalho com os colegas da equipa do Professor Doutor Jean-Claude Pihan. Em particular desejo agradecer o apoio e a disponibilidade da Madame Marie-Noel Bouvet na realização das análises histológicas e histoquímicas.

Os meus agradecimentos vão também para a Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica que parcialmente subsidiou a realização da dissertação.

À Eng. Leonor Amaral quero expressar o meu profundo reconhecimento pelo apoio e encorajamento à realização deste trabalho e, especialmente, pela sua preciosa ajuda na apresentação do mesmo.

Aos meus colegas do Departamento agradeço o apoio e a amizade que sempre me transmitiram, em particular à Dra Luisa Castro.

À Sra D. Carma Cruz Lopes quero agradecer a ajuda dada no processamento de texto, a disponibilidade e a eficiência com que o efectuou.

Aos meus pais agradeço o apoio e compreensão que sempre me demonstraram.

Ao Fernando, a minha profunda gratidão pelo carinho e apoio constante, sem os quais não teria sido possível a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

O presente trabalho tem por objectivo estudar a toxicidade do cobre para a carpa (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). A utilização deste material biológico, visa contribuir para o conhecimento da toxicidade do cobre para um ciprinídeo e, portanto, clarificar aspectos fundamentais relativos a uma importante categoria de peixes. Por outro lado, a carpa é uma espécie que tem considerável importância comercial, para além de se poder obter facilmente e de se adaptar bem a viver em laboratório. Simultaneamente, pretendeu-se que o estudo incidisse sobre um organismo que se pode considerar de referência, relativamente à toxicidade de metais, dadas as suas superfícies de troca com a água (pele, superfície branquial e tubo digestivo) e ainda os seus mecanismos de osmorregulação.

Revê-se a importância do cobre no meio aquático e apresentam-se resultados obtidos em experiências de intoxicação aguda, conduzindo à determinação da CL 50-48h, a diferentes valores de dureza da água, bem como os referentes a intoxicação crónica, utilizando diferentes fracções da CL 50. Esta forma de intoxicação, que reproduz melhor as condições típicas de contaminação que podem ocorrer nos meios naturais, foi realizada a concentrações constantes e a concentrações progressivamente crescentes, por forma a permitir avaliar a adaptação dos organismos.

As manifestações ecotoxicológicas foram seguidas através de dosagem do cobre bioacumulado nos diferentes órgãos, determinando-se factores de concentração e de poluição, bem como índices de concentração. Igualmente foi efectuado o estudo histológico, histoquímico e microanalítico das localizações de cobre, ao nível dos órgãos estudados (pele, brânquia, intestino, fígado, baço e rim), visando a sua detecção nas vias de entrada, de transporte, de armazenamento e de eliminação.

Através do estudo realizado, é possível propor valores de concentração de cobre aceitáveis para águas de ciprinídeos, em função de parâmetros

característicos do meio (dureza, pH), da sobrevivência dos organismos e da sua patologia.

Os resultados obtidos permitem concluir que a tolerância da carpa para o cobre é superior à da generalidade dos salmonídeos, variando com o tipo de intoxicação e com as características do meio. A dureza da água aumenta a tolerância do organismo para o cobre, embora conduzindo a concentrações de metal mais elevadas nos tecidos, com lesões mais significativas. A resposta dos organismos permite concluir que a sua tolerância não depende apenas da dose de intoxicação mas também do período de exposição, sendo ainda evidente uma significativa capacidade de adaptação. Por outro lado, verifica-se que o fígado é o órgão em que a acumulação de cobre é mais elevada, o que se admite ser consequência da formação de metalotioninas, sendo no músculo que se observam os valores mais baixos.

Através do exame histológico conclui-se que as manifestações histopatológicas dos órgãos em contacto com o meio se traduzem por reacções de "stress" (secreção de muco e de "substâncias de alarme"), observando-se ainda que a dose de 0.2 da CL 50-48h (intoxicação subletal) já provoca alterações da estrutura dos tecidos. O exame histoquímico permite concluir ter havido penetração de cobre nos tecidos, a qual foi confirmada por microanálise, especialmente na brânquia, em intoxicação aguda.

SUMMARY

The objective of the present work is to study the toxicity of copper to carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). This biological material is used in order to contribute to the knowledge of the copper toxicity to cyprinids and thus to clarify fundamental aspects related to an important category of fish. On the other hand, carp is a species with significant commercial value, easily obtained and well adapted to laboratory conditions. Simultaneously, it was intended to foccus the study on an organism that can be considered as a reference for metals toxicity, given its exchange surfaces with water (skin, gill surface and digestive tract) and its osmoregulation mechanisms.

The importance of copper to the aquatic environment is examined and results of acute intoxication assays are presented, which led to the evaluation of LC 50-48h at different water hardness values, as well as the results from chronic intoxication using different LC 50 fractions. This form of contamination, which aims to simulate more realistically the situations which typically occur in polluted environments, was carried out at constant doses and at progressively increasing doses in order to enable the evaluation of organisms' adaptation.

Ecotoxicological response was followed through bioaccumulated copper dosage in several tissues. Concentration and pollution factors, as well as concentration index were estimated. The study of histological, histochemical and microanalytical localization of copper in several organs (skin, gill surface and digestive tract) was also performed, envisaging metal detection at the pathways of intake, transport, storage and elimination.

Based on the results presented in this study, it is possible to propose values for acceptable copper concentrations in cyprinid waters, depending on water characteristics, such as hardness and pH, the organisms' survival and pathology.

Results have shown that the tolerance of the carp to copper is higher than most of the salmonids, varying with the type of intoxication and the characteristics of the water, organism's tolerance to copper is increased with water hardness, although leading to higher metal concentrations in the tissues and to more important damage. The response of organisms leads to the conclusion that their tolerance depends not only on the toxic dose but also on the exposure period, and a significant adaptation capacity was also demonstrated. It was observed that the liver is the organ with the highest accumulation of copper which is admitted as a consequence of the formation of metallothioneins. and the lowest values were found in the muscle.

On the basis of the histological study it is concluded that histopathological response of the organs in contact with water is mainly shown by stress reactions (mucosecretion and "alarm substances"), with tissue structure modifications occurring from 0.2 LC 50-48h. Through the histochemical study it was possible to demonstrate copper penetration into the tissues, which was confirmed with microanalyses, particularly in the gills, during acute intoxication.

INDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
SUMÁRIO	iii
SUMMARY.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
ÍNDICE DE ESTAMPAS.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. O COBRE NO MEIO AMBIENTE.....	7
2.1 Introdução	7
2.2 Aspectos biológicos.....	9
2.3 Efeitos na saúde humana	10
2.4 Aspectos principais da química do cobre em meios aquáticos	12
2.5 Especiação e biodisponibilidade	15
2.6 Toxicidade do cobre em relação aos organismos aquáticos	19
2.6.1 Microrganismos	22
2.6.2 Algas e plantas aquáticas	22
2.6.3 Peixes.....	23
2.7 Influência de factores abióticos e bióticos sobre a toxicidade do cobre...26	
2.7.1 Factores abióticos.....	26
2.7.1.1 Temperatura.....	26
2.7.1.2 Oxigénio dissolvido	27
2.7.1.3 pH.....	27
2.7.1.4 Dureza.....	28
2.7.2 Factores bióticos	31
2.8 Mecanismo de defesa nos peixes	33
2.8.1 Metaloprotéínas (MP)	34

3. TESTES DE TOXICIDADE	37
3.1 Introdução	37
3.1.1 Tipo de espécies utilizadas nos testes	39
3.1.2 Formas de exposição	40
3.1.2.1 Teste estático	40
3.1.2.2 Testes com recirculação	40
3.1.2.3 Teste com renovação (semi-estático)	41
3.1.2.4 Teste dinâmico	41
3.1.3 Descrição dos métodos utilizados nos testes de toxicidade	42
3.2 Testes de toxicidade aguda: CL 50-48h	43
3.2.1 Tóxicos de referência	44
3.3 Toxicidade crónica (Subletal). Bioacumulação	45
3.3.1 Testes de toxicidade monoespecíficos.....	47
3.3.2 Ecossistemas experimentais	49
3.3.3 Bioacumulação	50
3.3.3.1 Processos de acumulação	53
3.3.3.2 Vias de Absorção.....	54
3.3.3.3 Factores de Concentração e de Poluição	57
 4. PLANO EXPERIMENTAL	 59
 5. MATERIAIS E MÉTODOS	 61
5.1 Material Biológico: A Carpa.....	61
5.1.1 Introdução.....	61
5.1.2 Caracterização sistemática.....	61
5.1.3 Origem e área de expansão	62
5.1.4 Morfologia, anatomia e fisiologia geral.....	63
5.1.4.1 Morfologia	63
5.1.4.2 Anatomia	64
5.1.4.3 Fisiologia geral	65
5.1.5 Ecologia	69
5.1.6 Patologia e resposta à poluição	70
5.1.6.1 Modificações patológicas provocadas pelo meio ambiente.....	70
5.1.6.2 Modificações patológicas provocadas por bioagressores.....	71
5.1.7 Valor económico	73
5.2 Dispositivo experimental.....	75
5.3 Método experimental.....	75

5.3.1 Toxicidade aguda (CL 50-48h).....	75
5.3.2 Toxicidade crónica (Subletal).....	77
5.3.3 Técnicas analíticas.....	79
5.3.3.1 Preparação de amostras.....	79
5.3.3.1.1 Dosagem de cobre na água.....	79
5.3.3.1.2 Dosagem de cobre nos tecidos dos peixes.....	80
5.3.4 Técnicas de histologia, histoquímica e microanálise.....	82
5.3.4.1 Histologia topográfica.....	82
5.3.4.2 Histoquímica.....	83
5.3.4.3 Microanálise por impacto laser.....	85
5.4 Expressão dos resultados.....	86
5.4.1 Critério de avaliação da toxicidade do cobre.....	86
5.4.2 Critério de avaliação de retenção do cobre.....	86
6. RESULTADOS.....	89
6.1 Intoxicação aguda: CL 50-48h.....	89
6.1.1 Apresentação.....	89
6.1.2 Exploração e discussão.....	91
6.2 Intoxicação subletal. Bioacumulação. Adaptação.....	98
6.2.1 Apresentação.....	98
6.2.2 Exploração e discussão.....	108
6.3 Histologia, Histoquímica e Microanálise.....	127
6.3.1 Intoxicação aguda: CL 50-48h.....	127
6.3.1.1 Brânquias.....	127
6.3.1.2 Pele.....	129
6.3.1.3 Intestino.....	130
6.3.2 Intoxicação subletal (0.2 CL 50-48h).....	149
6.3.2.1 Efeito da dureza nos diferentes órgãos.....	149
6.3.2.1.1 Brânquias.....	149
6.3.2.1.2. Pele.....	150
6.3.2.1.3 Intestino.....	152
6.3.2.1.4 Fígado.....	153
6.3.2.1.5 Rim.....	153
6.3.2.1.6 Baço.....	154
6.3.3 Efeito do pH e do cobre sobre os diferentes órgãos.....	155
6.3.3.1 Brânquias.....	155
6.3.3.2 Pele.....	156
6.3.3.3 Intestino.....	157
6.3.3.4 Fígado.....	158

6.3.3.5 Rim	158
6.3.3.6 Baço	159
6.4 Síntese da discussão dos resultados	197
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	199
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203
ANEXOS	227

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Produção global de cobre (1850-1980)	8
Figura 2.2 - Comparação de constantes de estabilidade da formação de complexos inorgânicos de cobre.....	13
Figura 2.3 - Distribuição de espécies iónicas de cobre em água.	14
Figura 2.4 - Influência da alcalinidade e do pH na concentração de Cu (II).....	15
Figura 2.5 - Efeitos do cobre em peixes de água doce (concentrações limiares).....	25
Figura 2.6 - Equilíbrio cobre/bicarbonato numa solução contendo 5×10^{-3} M de bicarbonato de sódio	29
Figura 3.1 - Níveis de toxicidade do cobre para diferentes organismos.....	40
Figura 3.2 - Relação entre o enfraquecimento fisiológico de peixes após exposição a concentrações crescentes de poluentes e as disfunções provocadas.....	48
Figura 3.3 - Processos de assimilação, acumulação e eliminação de cobre	55
Figura 5.1 - Anatomia interna da carpa (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	64
Figura 5.2 - Relação média comprimento/peso na carpa (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	67
Figura 5.3 - Evolução do peso das carpas durante os primeiros sete anos de vida	68
Figura 5.4 - Esquema do dispositivo experimental	74
Figura 5.5 - Vista de conjunto do dispositivo experimental	74

Figura 5.6 - Técnica de preparação do material biológico para dosagem do cobre	81
Figura 6.1 - Influência da dureza na CL 50-48h de cobre para <i>Cyprinus carpio</i> L.	92
Figura 6.2 - Variação da CL 50-48h em função da dureza	94
Figura 6.3 - Variação dos valores estimados e observados da CL 50-48h	94
Figura 6.4 - Comparação da concentração máxima aceitável de tóxico para salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e ciprinídeos (presente estudo).....	97
Figura 6.5 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nos diferentes tecidos durante 3 semanas para a dureza da água de 50 mg.l ⁻¹ CaCO ₃	108
Figura 6.6 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nos diferentes tecidos durante 3 semanas para a dureza da água de 100mg.l ⁻¹ CaCO ₃	108
Figura 6.7 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nos diferentes tecidos durante 3 semanas para a dureza da água de 300mg.l ⁻¹ CaCO ₃	109
Figura 6.8 - Acumulação relativa de cobre nos diferentes tecidos em função da CL 50-48h durante 3 semanas para a dureza da água de 50 mg.l ⁻¹ CaCO ₃	110
Figura 6.9 - Acumulação relativa de cobre nos diferentes tecidos em função da CL 50-48h durante 3 semanas para a dureza da água de 100 mg.l ⁻¹ CaCO ₃	110
Figura 6.10 - Acumulação relativa de cobre nos diferentes tecidos em função da CL 50-48h durante 3 semanas para a dureza da água de 300 mg.l ⁻¹ CaCO ₃	111
Figura 6.11 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nas brânquias (Experiência 2, Fase Experimental II)	112

Figura 6.12 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) no músculo (Experiência 2, Fase Experimental II).....	112
Figura 6.13 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) no tubo digestivo (Experiência 2, Fase Experimental II).....	113
Figura 6.14 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) no fígado (Experiência 2, Fase Experimental II).....	113
Figura 6.15 - Factores de concentração nos diferentes tecidos, para as três durezas de água testadas (50, 100 e 300 mg.l ⁻¹ CaCO ₃).....	114
Figura 6.16 - Factores de concentração nos diferentes órgãos para as três durezas de água testadas (50, 100 e 300 mg.l ⁻¹ CaCO ₃).....	115
Figura 6.17 - Factores de Poluição nos diferentes tecidos, para as três dureza de água testadas (50, 100 e 300 mg.l ⁻¹ CaCO ₃).....	116
Figura 6.18 - Índices de Concentração (%) nos diferentes tecidos, para as três durezas de água testadas(50, 100 e 300 mg.l ⁻¹ CaCO ₃).....	117
Figura 6.19 - Variação da "vida média" do metal com a dureza da água.....	119
Figura 6.20 - Concentração de cobre nos diferentes órgãos dos indivíduos "testemunha" e dos indivíduos expostos a 0.2 da CL 50-48h, em função do pH, durante uma semana	120
Figura 6.21 - Acumulação de cobre nas brânquias durante 4 semanas a diferentes fracções da CL 50-48h	121
Figura 6.22 - Acumulação de cobre no músculo durante 4 semanas a diferentes fracções da CL 50-48h	121
Figura 6.23 - Acumulação de cobre no tubo digestivo durante 4 semanas a diferentes fracções da CL 50-48h.....	122

Figura 6.24 - Acumulação de cobre no fígado durante 4 semanas a diferentes fracções da CL 50-48h.....	122
Figura 6.25 - Acumulação de cobre (0.1 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos	123
Figura 6.26 - Acumulação de cobre (0.2 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos	124
Figura 6.27 - Acumulação de cobre (0.3 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos	124
Figura 6.28 - Acumulação de cobre (0.4 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos	125
Figura 6.29 - Acumulação de cobre a fracções crescentes da CL 50-48h durante 4 semanas nos diferentes órgãos.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais minérios de cobre	7
Tabela 2.2 - Química de coordenação do cobre (aspectos principais).....	13
Tabela 2.3 - Concentrações de cobre em organismos de água doce.....	21
Tabela 2.4 - Concentrações letais de cobre em diferentes espécies de peixes	23
Tabela 2.5 - Concentrações letais de cobre total e dissolvido para <i>Phoxinus phoxinus</i>	30
Tabela 4.1 - Plano experimental das experiências realizadas	60
Tabela 6.1 - Variação sazonal da CL 50-24h do tóxico de referência ($K_2Cr_2O_7$) para <i>Cyprinus carpio</i> L.	89
Tabela 6.2 - Variação sazonal da CL 50-48h do cobre para <i>Cyprinus carpio</i> L. a diferentes durezas da água.....	90
Tabela 6.3 - Variação sazonal da CL 50-48h do cobre para <i>Cyprinus carpio</i> L. a valores extremos de pH da água (respectivamente 5 e 9).....	90
Tabela 6.4 - Comparação das CL 50-48h do cobre para salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e ciprinídeos (presente estudo).....	92
Tabela 6.5 - Valores da CL 50 de cobre a diferentes durezas para ciprinídeos	95
Tabela 6.6 - Comparação da concentração máxima aceitável de tóxico para salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e ciprinídeos (presente estudo), respectivamente 0.05 e 0.2 da CL 50 para 50% e 95% das frequências anuais	96
Tabela 6.7 - Concentração de cobre ($\mu g \cdot g^{-1}$ peso seco $\pm \sigma$) nas brânquias de <i>Cyprinus carpio</i> L. expostas a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($CaCO_3$ $mg \cdot l^{-1}$)	98

Tabela 6.8 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no músculo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	99
Tabela 6.9 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no tubo digestivo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	99
Tabela 6.10 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no fígado de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	100
Tabela 6.11 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) nas brânquias de <i>Cyprinus carpio</i> L. expostas a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas.....	100
Tabela 6.12 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no músculo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas.....	101
Tabela 6.13 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no tubo digestivo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas.....	101
Tabela 6.14 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no fígado de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas.....	102
Tabela 6.15 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) em diferentes tecidos de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a frações crescentes de CL 50-48h na água, durante 4 semanas	102
Tabela 6.16 - Concentração de Cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) em tecidos de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a 0.2 da CL 50-48h de cobre na água durante 1 semana variando os valores de pH na água	103

Tabela 6.17 - Factores de concentração (FC) de cobre nas brânquias de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	103
Tabela 6.18 - Factores de Poluição (FP) de cobre nas brânquias de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	104
Tabela 6.19 - Índices de concentração (IC%) de cobre nas brânquias de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	104
Tabela 6.20 - Factores de concentração (FC) de cobre no músculo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	104
Tabela 6.21 - Factores de Poluição (FP) de cobre no músculo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	105
Tabela 6.22 - Índices de concentração (IC%) de cobre no músculo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	105
Tabela 6.23 - Factores de concentração (FC) de cobre no tubo digestivo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	105
Tabela 6.24 - Factores de Poluição (FP) de cobre no tubo digestivo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	106
Tabela 6.25 - Índices de concentração (IC%) de cobre no tubo digestivo de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	106
Tabela 6.26 - Factores de concentração (FC) de cobre no fígado de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)	106

Tabela 6.27 - Factores de Poluição (FP) de cobre no fígado de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$).....	107
Tabela 6.28 - Índices de concentração (IC%) de cobre no fígado de <i>Cyprinus carpio</i> L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$).....	107
Tabela 6.29 - Valores das constantes de acumulação e de eliminação da equação de John (1987).....	118
Tabela 6.30 - Comparação da acumulação de cobre por intoxicação constante e gradual.....	126

ÍNDICE DE ESTAMPAS

ESTAMPA I.....	133
ESTAMPA II.....	135
ESTAMPA III.....	137
ESTAMPA IV.....	139
ESTAMPA V.....	141
ESTAMPA VI.....	143
ESTAMPA VII.....	145
ESTAMPA VIII.....	147
ESTAMPA IX.....	161
ESTAMPA X.....	163
ESTAMPA XI.....	165
ESTAMPA XII.....	167
ESTAMPA XIII.....	169
ESTAMPA XIV.....	171
ESTAMPA XV.....	173
ESTAMPA XVI.....	175
ESTAMPA XVII.....	177
ESTAMPA XVIII.....	179
ESTAMPA XIX.....	181
ESTAMPA XX.....	183
ESTAMPA XXI.....	185
ESTAMPA XXII.....	187
ESTAMPA XXIII.....	189
ESTAMPA XXIV.....	191
ESTAMPA XXV.....	193
ESTAMPA XXVI.....	195

1. INTRODUÇÃO

As actividades antropogénicas têm alterado as condições de circulação dos constituintes normais da biosfera, nomeadamente dos metais pesados. Têm-se verificado transformações dos ciclos geoquímicos dos diferentes elementos metálicos, tendo como consequência a sua introdução generalizada, a taxas elevadas, nos meios aquáticos (continentais e marinhos). Resultam assim contaminações preocupantes, visto que os metais não são degradados, contrariamente à maior parte dos compostos orgânicos, acumulando-se portanto nos sistemas hídricos, principalmente nos sedimentos, através de diferentes processos físico-químicos (adsorção, complexação, etc.).

A investigação sobre as disfunções ambientais devidas a contaminação por metais, teve um desenvolvimento muito importante nos últimos trinta anos, sobretudo depois de se verificarem graves problemas de saúde pública, como por exemplo os que foram provocados pela doença de Minamata (contaminação por mercúrio) e pela doença de Itai Itai (intoxicação por cádmio).

De um modo geral, considera-se que a contaminação do meio ambiente por metais tem como origens mais importantes, as seguintes: (1) processos naturais de erosão; (2) actividade mineira; (3) utilização industrial de metais e compostos metálicos; (4) lixiviados resultantes da deposição de resíduos; (5) excreções animais (Förstner e Wittmann, 1983).

O cobre é considerado um dos metais pesados mais importantes do ponto de vista de poluição da água, visto que, embora sendo um dos elementos essenciais à vida, torna-se tóxico a partir de determinadas concentrações. O seu estudo na ecosfera tem constituído o objectivo de numerosos trabalhos de investigação (Nriagu, 1979 b; Loneragan e col., 1981; Demayo e col., 1982; Haque e Subramanian, 1982; Buckley e col., 1984; Harrison, 1986).

O aumento das concentrações de cobre no meio ambiente, tal como acontece com os outros metais, pode ser atribuído tanto a processos naturais como antropogénicos. No caso do cobre, os acréscimos

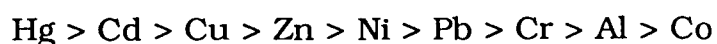
verificados nos vários ecossistemas resultam principalmente de actividades humanas, tais como a exploração mineira (Jackson, 1978; Hutchinson, 1979; Taylor e col., 1981), as descargas industriais (Paul e Pillai, 1983 a; 1983 b), os esgotos urbanos (Emmerrich e col., 1982 a,b; Mullins e col., 1982; Taylor e col., 1982), e a utilização de fertilizantes e pesticidas (McIntosh, 1974; Thornton, 1979), entre outras.

A exploração mineira constitui uma das principais origens de cobre no meio ambiente, principalmente devido à utilização de água em diversas operações o que pode provocar infiltrações e escoamentos superficiais com elevado teor do metal (Clarke, 1974; Albouy e col., 1981). Para além de elevada concentração em metais pesados, estas águas têm associados outros problemas de qualidade, como valores extremos de pH, dureza elevada, baixo teor de oxigénio e presença de produtos químicos utilizados no processo de extracção (Waiwood, 1977).

O cobre é amplamente utilizado na indústria eléctrica, como componente principal no fabrico de condutores, e, acessoriamente, noutras indústrias, tais como a indústria têxtil, da borracha, do papel e de construção. É ainda encontrado nas águas residuais domésticas, devido ao contacto da água com os materiais das canalizações e também em efluentes de indústrias agro-alimentares, como a suinicultura, visto que é utilizado em rações animais. Outra origem importante de cobre no meio ambiente é a sua utilização em produtos para protecção de culturas agrícolas, como no caso dos fungicidas usados na vinha, no tratamento do míldio. Devido ao seu baixo custo, a utilização, para esta finalidade, de produtos à base de cobre teve larga difusão, pelo que ainda hoje persistem efeitos dessa prática, os quais se admite ocorrerem em algumas zonas do nosso país, dado que a cultura da vinha ocupa uma área estimada em 380.000 ha (Simões, 1980).

A Biologia parece interessar-se particularmente pelo estudo deste metal, dado que são muito próximos os valores das concentrações necessárias ao crescimento e desenvolvimento dos organismos vivos e as que lhes provocam efeitos prejudiciais. Para além disso, em alguns ambientes naturais, em determinadas épocas do ano, têm sido detectadas concentrações de cobre que atingem níveis susceptíveis de afectar espécies sensíveis.

De um modo geral, para uma dada espécie, a toxicidade dos metais pesados, quando considerados isoladamente, varia, como a seguir se indica, por ordem decrescente de importância (Moore e Ramamoorthy, 1984). Esta ordem pode alterar-se não só por efeitos de interacção, mas também com as condições ambientais, as quais influenciam a especiação química dos metais.



Na ordem indicada, a toxicidade do cobre surge portanto como uma das mais importantes.

Sendo cada vez maior o número de substâncias químicas utilizadas para fins industriais, agrícolas e domésticos, reveste-se de grande importância, face aos inerentes riscos de contaminação dos meios aquáticos, a avaliação da toxicidade daquelas substâncias, dos seus produtos intermédios e dos respectivos produtos de degradação.

Os poluentes tóxicos podem exercer os seus efeitos por diversas vias, dependendo das suas características, das do meio em que se encontram e da comunidade biológica que aquele meio suporta.

Do ponto de vista biológico, qualquer efeito tóxico é significativo se influenciar, ou potenciar, modificações da fisiologia ou do comportamento de um organismo, de tal forma que altere a sua capacidade de crescimento, reprodução, mortalidade ou a sua matriz de dispersão, visto serem estes os principais determinantes da distribuição e abundância das espécies. Mesmo as espécies que não sejam directamente influenciadas por um poluente, podem, por via indirecta, sofrer os efeitos da toxicidade de um determinado produto, como por exemplo, o predador que é privado da presa, quando esta é afectada pelo poluente. Ambos se reduzirão, ou o predador poderá ser levado a utilizar outra presa. De facto, o efeito de um poluente tóxico só pode ser compreendido globalmente se se dispuser de informação sobre os aspectos trófico, competitivo e de relação entre espécies, envolvidos. Por outro lado, a sua toxicidade sob determinadas condições, é função da respectiva estrutura química e configuração, e,

de um modo geral, modificações da respectiva molécula determinam alterações da sua toxicidade.

No caso dos iões de metais pesados, a toxicidade varia com a forma em que se encontram no meio: dissolvida, coloidal ou particulada, bem como com o seu estado de oxidação, e se se trata de iões simples, ou de complexos, orgânicos ou inorgânicos. (Borgmann e Ralph, 1983; Fisher e col., 1990). Assim, as condições ambientais, influenciando a forma química dos metais, são factores determinantes para a respectiva toxicidade (Chakoumakos e col., 1979; Bennett e Dooley, 1982; Laurén e McDonald, 1986).

Os efeitos do cobre no meio aquático dependem, para além da respectiva concentração na água, da sua adequação biológica e, necessariamente, do tipo de organismo(s) presente(s). A sua presença no meio, em quantidades adequadas, não põe problemas de armazenamento pelos organismos, embora a forma em que se encontra possa limitar-lhes a sua utilização. Por outro lado, a sua associação com partículas em suspensão ou com compostos orgânicos pode reduzir sensivelmente a sua disponibilidade.

As dificuldades em fixar teores máximos de cobre em padrões de qualidade de meios hidrícos parecem resultar da contradição existente nos valores disponíveis relativos à toxicidade, registando variações significativas na resposta dos organismos ao metal, as quais se atribuem a diferenças de sensibilidade entre espécies e estados de desenvolvimento (Tsai e Chang, 1981; Herbert e Peterle, 1990).

Em água para consumo humano o teor em cobre é fixado, não por razões de toxicidade, mas porque a sua presença confere um gosto desagradável à água, o que se verifica a partir de concentrações da ordem de 1 e 2 mg l⁻¹. (Levesque, 1979). A norma europeia indica uma concentração de cobre de 0.05 mg.l⁻¹ como valor guia admissível (Directiva do Conselho das Comunidades Europeias de 16 de Junho de 1975). As normas americanas (USEPA, 1985 b) adoptam um valor bastante mais elevado, 1 mg.l⁻¹, indicando também teores máximos para irrigação e descargas de águas residuais em cursos de água

(irrigação contínua: 0.2 mg.l⁻¹; irrigação intermitente: 5.0 mg.l⁻¹; descargas de águas residuais em cursos de água: < 0.5 mg l⁻¹.)

A informação disponível sobre a toxicidade do cobre para peixes não salmonídeos é bastante reduzida, a tal ponto que a Directiva sobre a qualidade das águas piscícolas de 78/07/18 não distingue entre salmonídeos e ciprinídeos.

2. O COBRE NO MEIO AMBIENTE

2.1 Introdução

O cobre encontra-se amplamente distribuído na natureza, quer no estado livre, quer na forma de sulfuretos, arsenitos, cloretos e carbonatos (Moore e Ramamoorthy, 1984), em depósitos de cuprite, malaquite, azurite, calcopirite e bornite. É um metal macio e dúctil, com elevadas condutividades, térmica e eléctrica, e boa resistência à corrosão. Os sulfuretos de cobre são os compostos mais valiosos, dado que permitem a obtenção do metal por processos mais simples e menos onerosos (Jensen e Bateman, 1981).

Na Tabela 2.1 indicam-se os principais minérios de cobre.

Tabela 2.1 - Principais minérios de cobre

Mineral	Composição	Teor em Cobre %
Cobre natural	Cu	100
Bornite	Cu_5FeS_4	63
Brochantite	$\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$	62
"Calcocite"	Cu_2S	80
Calcopirite	CuFeS_2	34
Covelite	CuS	66
Cuprite	Cu_2O	89
Digenite	Cu_9S_5	78
Enargite	$3\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{As}_2\text{S}_5$	48
Malaquite	$\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	57
Azurite	$2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$	55
Crisocola	$\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36

(Adaptado de Jensen e Bateman, 1981)

Os depósitos mais importantes de cobre situam-se na orla montanhosa do Pacífico, na Europa e na Ásia (Moore e Ramamoorthy, 1984). O seu teor médio na litosfera é da ordem dos 50 mg.l^{-1} , estimando-se que para

cobre em águas naturais. Em águas naturais a concentração de cobre pode variar entre 0,05 mg.l^{-1} (Mackee e Wolg, 1963), sendo comum encontrar-se, também, da ordem de 1 a 25 mg.l^{-1} .

Para se ter uma idéia da evolução da produção de cobre, de acordo com o relatório publicado pelo "US Mineral Yearbooks" (Nriagu, 1979 b), atualmente aproximadamente 80% da produção total teve lugar durante o século XX.

Atualmente, o cobre ocorre na forma livre, constituindo os sulfuretos e óxidos, a maior parte da produção total (Piscator, 1979).

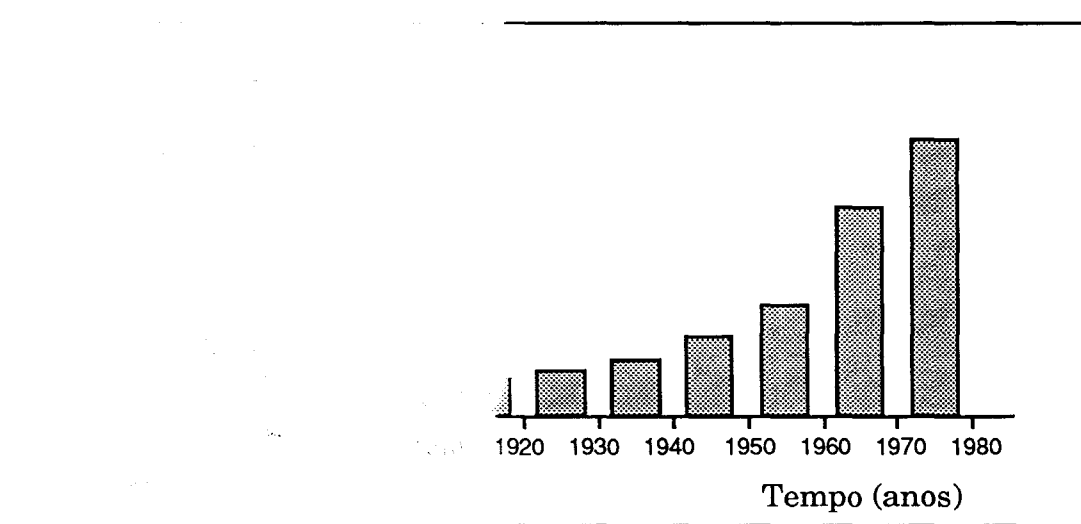


Figura 4.2 - Produção global de cobre (1850-1980)

Devido às suas características propícias à formação de compostos solúveis e degradáveis, têm determinado o uso universal do cobre em várias indústrias, como foi anteriormente referido. Atualmente, quase toda a produção seja consumida pela indústria metalúrgica. O cobre é ainda utilizado pela indústria de engenharia, metalurgia e pela indústria química, nomeadamente para a produção de compostos. Considera-se o "metal da prosperidade" devido ao seu uso normalizado visto que o seu consumo está normalmente associado ao desenvolvimento material e ao desenvolvimento.

O aparecimento de cobre nos meios aquáticos deve-se, fundamentalmente, à acção erosiva da água, em solos e depósitos minerais, e a actividades antropogénicas. A quantidade de cobre proveniente destas actividades, dependendo da sua dimensão e do seu tipo (urbano ou industrial), pode ultrapassar o fluxo terrestre natural atingindo níveis muito elevados.

Nos meios aquáticos, a concentração de cobre na coluna de água não depende apenas da quantidade de metal afluente das áreas contribuidoras, mas é sobretudo função das características do meio. Com efeito, grande parte dos meios naturais têm capacidade para modificar as formas químicas de cobre, convertendo formas solúveis em insolúveis, como acontece nos rios e nos lagos devido a fenómenos químicos (precipitação, complexação ou matéria particulada em suspensão). Parte do cobre acumular-se-á portanto nos sedimentos, podendo ser mobilizado quer por variações do regime hidráulico do meio (resuspensão), quer por variação de condições químicas (oxigenação) ou biológicas (degradação de complexos orgânicos). Os estuários constituem normalmente um local de importante deposição de cobre, não só pela quantidade transportada, na forma particulada, pelos cursos de água, mas também pela mobilização de formas adsorvidas devido à variação da força iónica do meio.

No biota, a acumulação relativa por nível trófico tende a diminuir para os níveis superiores, o que deverá resultar por um lado das interacções inerentes à cadeia trófica e, portanto, da capacidade de acumulação e de regulação metabólica dos diferentes organismos. Para os principais grupos taxonómicos é possível identificar organismos indicadores, isto é, cuja capacidade de acumulação é relacionável com os teores de cobre no respectivo ambiente.

2.2 Aspectos biológicos

O cobre é um elemento essencial que intervém no metabolismo celular nomeadamente associado a proteínas, como a hemocianina, a tirosinase, a ceruloplasmina, etc, que estão implicadas nas reacções de oxidação-redução, na produção de energia e em outros processos fisiológicos.

Nestas proteínas, o cobre encontra-se ligado com os grupos azotados, oxigenados e sulfurados (Moore e Ramamoorthy, 1984)

Em doses fracas estimula a fotossíntese (Manaham e Smith, 1973) mas torna-se rapidamente tóxico, principalmente devido ao facto de aumentar a permeabilidade membranar e assim provocar a saída de potássio (Mackee e Wolg, 1963). A sua capacidade para formar complexos, pode também provocar efeitos nocivos, pela sua competição com outros iões, a nível das proteínas (osmorregulação, por exemplo).

Nos animais, o fígado é o órgão que retém maior quantidade de cobre. No homem, cerca de 65% do teor em cobre do fígado corresponde à fracção solúvel e apenas 8% às mitocôndrias. As metalotioninas, conhecidas pela sua grande capacidade de armazenamento de metais, também o contém (Evans, 1973).

Nos peixes, o teor de cobre no fígado varia, consoante a espécie e o regime alimentar, registando-se a título de exemplo, algumas ordens de grandeza observadas: *Noemacheilus barbatulus*, 156 mg.l⁻¹ (Solbé e Copper, 1976); *Salmo gairdneri*, 180 mg.l⁻¹ (Calamari e Marchetti, 1973); *Scardinius erythrophthalmus*, 9 mg.l⁻¹ (Van Hoof e Van San, 1981).

2.3 Efeitos na saúde humana

A importância do cobre para a saúde humana decorre deste elemento ser um constituinte essencial de diversas enzimas e do seu envolvimento na mobilização do ferro para a síntese da hemoglobina (O'Dell, 1976). A sua carência causa anemia e diminui a resistência às infecções.

Na dieta alimentar média o consumo de cobre é de 1 a 3 mg por dia, o que corresponde a 15-45 µg Cu Kg⁻¹ de peso, em adultos (Robinson e col., 1973; Alexander e col., 1974; Klevay, 1975; Aaseth e Norseth, 1986), sendo as necessidades diárias de adultos e crianças, de 30 a 80 µg Cu.Kg⁻¹ de peso, respectivamente, segundo a OMS (WHO, 1980).

No organismo humano, a absorção de cobre é de cerca de 50% da ingestão, sendo regulada por sequestro pela ceruloplasmina, enzima presente no sangue e noutros tecidos. Deficiências extremas de ceruloplasmina, resultantes de um erro congénito do metabolismo, provocam acumulações patológicas de cobre nos tecidos e danos no cérebro, no fígado e nos rins, constituindo a doença de Wilson (Aaseth e Norseth, 1986).

A ingestão de quantidades excessivas de cobre pode provocar distúrbios gastrointestinais, sendo referidos casos de diarreia em crianças de zonas em que água de abastecimento continha cerca de 1 mg.l^{-1} de cobre (Aaseth e Norseth, 1986).

Um número considerável de casos de cirrose da infância tem sido observado na Índia ("Indian Childhood Cirrosis - ICC") (Bhave e col., 1987). Esta doença incidindo em crianças com idades compreendidas entre 1 e 3 anos, provoca a cirrose típica do fígado, muitas vezes com consequências fatais. Através do exame do fígado foram detectados elevados níveis de cobre, admitindo-se portanto uma relação directa com o aparecimento da doença, sendo o uso de utensílios de latão, na preparação de alimentos, considerado como uma fonte importante na ingestão excessiva de cobre. Recentemente, na Alemanha, foi identificada uma doença com sintomatologia semelhante à "ICC", sendo igualmente observados níveis muito elevados de cobre no fígado ($700 \mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco), admitindo-se que a contaminação seja devida a consumo de água com concentrações de cobre de 2 a 3 mg.l^{-1} . Um caso semelhante é também relatado em Itália (Maggiore e col., 1987). Em águas subterrâneas, apesar da concentração de cobre depender do pH do solo, normalmente, não excede alguns microgramas por litro. No entanto, em águas superficiais já foram detectados níveis de cerca de $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Steinnes, 1990).

Nos últimos anos tem merecido especial atenção a eventual relação entre o aumento dos teores de metais em águas de abastecimento ácidas e a incidência de problemas de saúde pública (Nordberg e col., 1985), nomeadamente as potenciais consequências da utilização de canalizações de cobre. Com efeito, nos casos em que a água fornecida tem um pH ácido, pode ocorrer dissolução do cobre, especialmente se

for elevado o tempo de residência da água no sistema, determinando teores inaceitáveis, para além de fenómenos de corrosão das canalizações.

O cobre pode ainda provocar outro tipo de problemas de saúde humana, quando ingerido em quantidades excessivas por via respiratória, como irritações localizadas ou lesões pulmonares crónicas (Piscator, 1979).

Para além das vias de ingestão de cobre referidas, a eventual contaminação da cadeia alimentar do homem, em consequência de inadequado controlo de poluição, pode também constituir um risco adicional para a saúde pública (Moore e Ramamoorthy, 1984).

2.4 Aspectos principais da química do cobre em meios aquáticos

O cobre é um dos elementos de transição do Quadro Periódico (Grupo IB), sendo tradicionalmente um dos metais de cunhagem, tal como a prata e o ouro, devido à sua resistência à corrosão. Tem uma estrutura cúbica compacta, exibindo propriedades metálicas típicas (Heslop e Robinson, 1967).

A característica química mais importante do cobre é a de se poder apresentar com três estados de oxidação (+1, +2, +3), tendo uma forte tendência para formar iões complexos, principalmente através de ligações covalentes.

Em solução aquosa o Cu (II) é o estado de oxidação normal dos respectivos complexos metálicos, sendo Cu (I) o estado característico dos complexos aquosos insolúveis. Complexos Cu (III) encontram-se em reduzido número, sendo instáveis em solução aquosa.

A substituição de moléculas de água no ião $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ por ligandos mono ou polidentados, dá origem à formação de complexos de coordenação com diferentes estabilidades. Na Tabela 2.2, resumem-se alguns aspectos principais da formação de compostos de coordenação de cobre, adoptando o princípio dos ácidos e bases fortes e fracas (Leckie e Davis, 1979).

Tabela 2.2 - Química de coordenação do cobre (aspectos principais)

Estado de Oxidação	Ácido		Base	
	Forte	Fraco	Forte	Fraca
Cu (I)	○			● (1)
Cu (II)		○	●	● (2)

○ - classificação; ● - formação de complexos

(1) Ligação típica (I^- , S^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, etc)

(2) Ligação típica (CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , OH^- , Cl^- , etc)

A estabilidade relativa dos complexos de Cu(I) e Cu(II) em solução, para além de depender da natureza dos ligandos presentes, varia com a composição da solução.

Na Figura 2.2, comparam-se as constantes de estabilidade (Stumm e Morgan, 1981) de diferentes complexos de cobre .

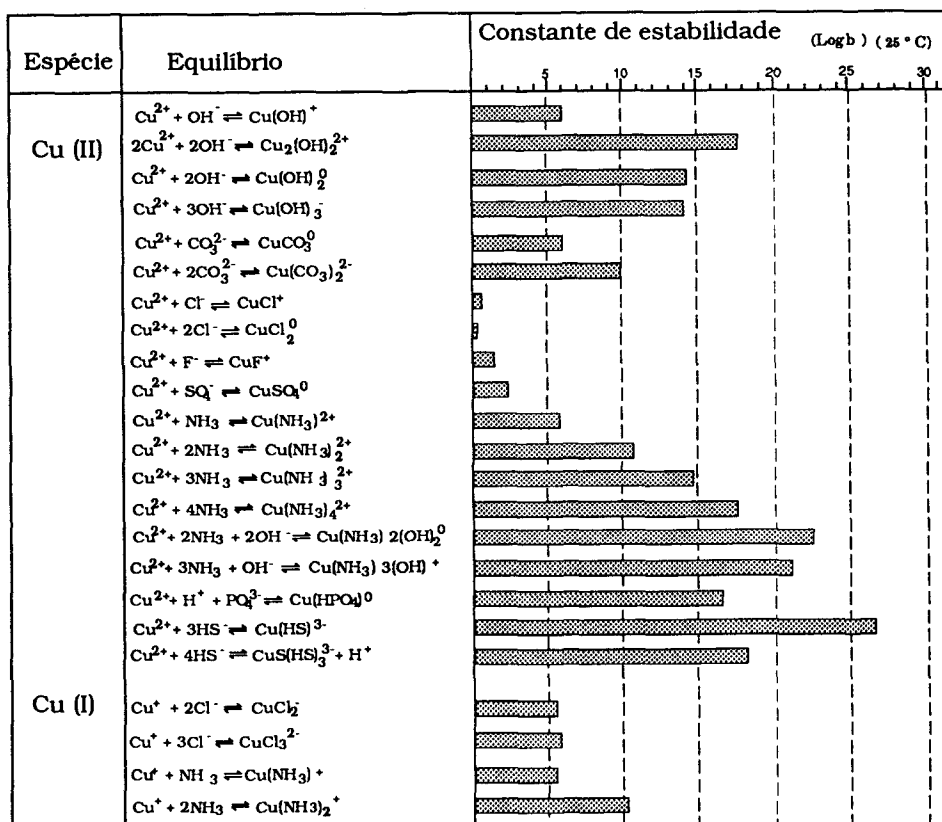


Figura 2.2 - Comparação de constantes de estabilidade da formação de complexos inorgânicos de cobre

Constata-se assim, que os complexos Cu(II) são os mais importantes para os sistemas aquáticos, não só pela sua estabilidade em solução, como também pela sua grande diversidade.

Nos sistemas aquáticos, a complexação do cobre por ligandos inorgânicos é particularmente importante, uma vez que se podem alterar os efeitos do metal no correspondente ecossistema.

A título ilustrativo, reproduz-se na Figura 2.3, a distribuição de espécies iónicas de cobre numa água com uma concentração de carbonato de 10^{-3} M.

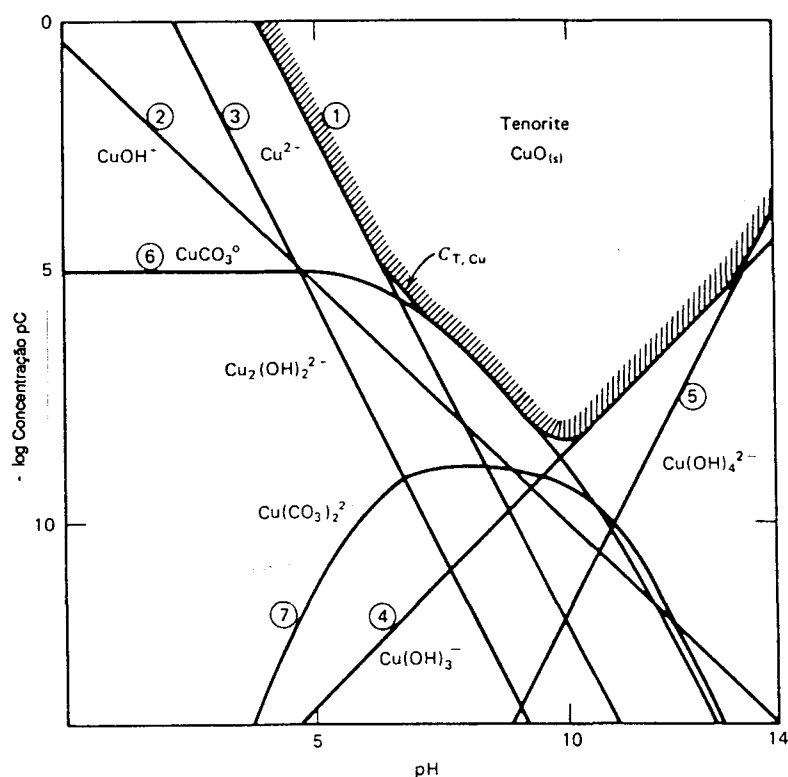


Figura 2.3 - Distribuição de espécies iónicas de cobre em água (Snoeyink e Jenkins, 1980)

Este exemplo, permite identificar a importância do pH da solução para a distribuição das espécies iónicas, verificando-se que para os valores habituais em águas naturais (6.5 a 9.5) predomina a espécie CuCO_3^0 . Admitindo que para aquela faixa de valores de pH, a concentração de Cu(II) seja controlada pela reação : $\text{Cu}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{CuCO}_3^0$ ($\log K=6.8$), compara-se, na Figura 2.4, a influência da alcalinidade e do pH na concentração da referida espécie iónica (Snoeyink e Jenkins, 1980).

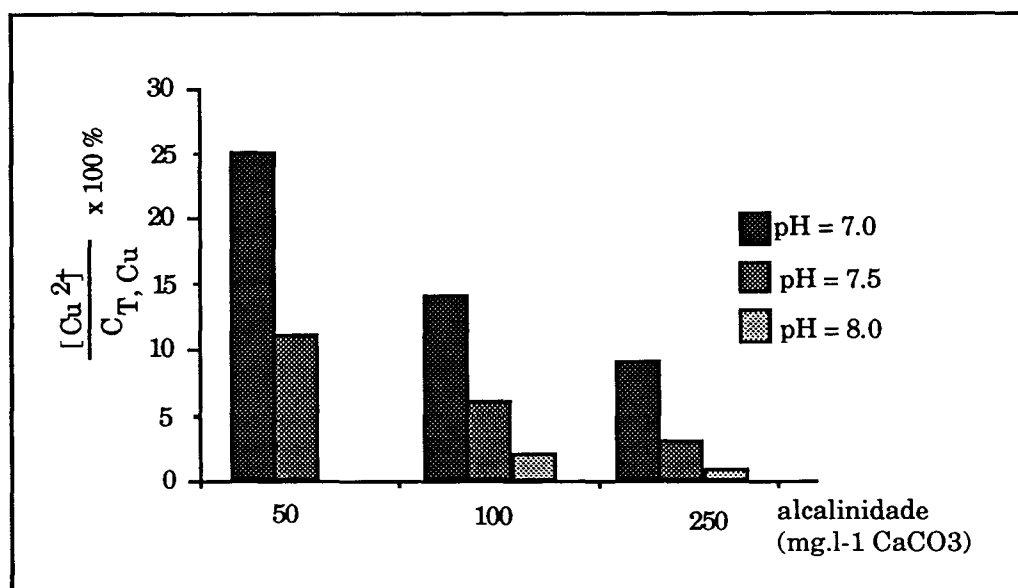


Figura 2.4 -Influência da alcalinidade e do pH na concentração de Cu (II)

Como se pode observar, o efeito da alcalinidade é muito importante para a formação de complexos de cobre. Com efeito, na ausência de agentes complexantes e adsorventes, a especiação do cobre é determinada pela alcalinidade e pelo pH, predominando as espécies Cu^{2+} e CuCO_3 (águas doces). Como normalmente a dureza segue uma variação correspondente à da alcalinidade e como a toxicidade do cobre varia com as respectivas espécies iônicas, parece poderem-se assim validar as observações relativas à variação da toxicidade do cobre com a dureza da água.

2.5 Especiação e Biodisponibilidade

A forma química em que um metal se encontra na água, e consequentemente a sua toxicidade, depende, principalmente de processos de complexação (com ligandos orgânicos ou inorgânicos) e de adsorção (argilas, partículas inorgânicas e óxidos de metais) (Spear e Pierce, 1979). A toxicidade dos metais é muitas vezes expressa em relação à sua concentração total, sem considerar a interação do metal com os constituintes do meio, isto é, não identificando as espécies químicas presentes.

Embora tradicionalmente a toxicidade do cobre, e de outros metais, em diferentes meios e para diversos organismos, se refira à concentração total do metal, há todo o interesse em conhecer a sua especiação, especialmente para se poder avaliar a sua biodisponibilidade (Thornton, 1979; Harrison e col., 1981; Emmerich e col., 1982 a,b; Schalscha e col., 1982). Por outro lado, a expressão da toxicidade de um metal não deve dissociar-se do contexto ambiental e dos factores físico-químicos que caracterizam o meio, sendo necessário dispôr de informação sobre os seguintes aspectos:

- forma em que o metal se encontra na água (solúvel, insolúvel);
- existência de ligandos (orgânicos, inorgânicos);
- presença de outros metais ou tóxicos (efeitos de sinergismo e de antagonismo);
- factores que influenciam a resistência dos organismos (temperatura, pH, oxigénio dissolvido, salinidade);
- características dos organismos expostos (tamanho, sexo, etapa do ciclo biológico).

De um modo geral, pode considerar-se que as reacções de complexação são o tipo de reacção química verdadeiramente determinante para a disponibilidade dos tóxicos e, conseqüentemente, para a actividade biológica do meio.

A toxicidade de um metal livre determinada pela actividade do respectivo ião, varia quando em presença de agentes quelantes, artificiais ou naturais, podendo, através do conhecimento da "capacidade de complexação" da água ter-se indicação da fracção biodisponível do metal.

Em meios aquáticos naturais, 58-98% do cobre pode estar ligado a ligandos orgânicos, variando esta forma de complexação directamente com o pH e o potencial redox do meio (Spear e Pierce, 1979).

Nos estudos em que a especiação foi tida em conta, adoptaram-se modelos de simulação das reacções químicas no meio, assumindo determinadas condições de partida. Constata-se que, dependendo dos valores das constantes adoptadas e do nível de sofisticação dos

programas informáticos de suporte dos modelos, são significativas as variações das concentrações das diferentes espécies químicas. Igualmente, uma pequena variação de um parâmetro físico-químico pode traduzir-se em importantes efeitos biológicos, pelo que a interpretação de resultados da especiação deve ser extremamente cautelosa.

A biodisponibilidade depende directamente, da especiação, isto é, da(s) forma(s) química(s) do metal. A concentração de um metal nos tecidos de um organismo é portanto função da sua biodisponibilidade no meio, a qual se define em relação a determinada espécie, sendo consequência dos seus hábitos alimentares e das suas vias bioquímicas próprias (Phillips e Rainbow, 1988).

Em meios dulceaquícolas, a maior parte do metal encontra-se adsorvido na fase inorgânica (Phillips, 1977). Para Stackhouse e Benson (1989), a adsorção é uma das propriedades mais importantes dos metais relativamente aos seus efeitos no meio ambiente. Efectivamente, para ser absorvido, um metal tem que previamente se adsorver à superfície lipídica da membrana celular ou fixar-se a transportadores proteicos (Nelson e Doukin, 1985). O poder adsorvente é modulado pela presença de quelantes naturais no meio, tendo Nelson e Doukin (1985) posto a hipótese de que os ácidos húmicos poderiam favorecer a acumulação dos metais pouco lipófilos, aumentando a sua biodisponibilidade em consequência de uma adsorção facilitada.

A forma do metal na água, determinando a sua biodisponibilidade e consequentemente a sua bioacumulação está, por sua vez, sob a dependência de factores físico-químicos exógenos, como o pH, para cádmio e cobre, e a dureza da água, para o zinco (Bradley e Sprague, 1985).

O pH é um dos factores físico-químicos importantes, podendo, como anteriormente se mostrou, determinar a forma do metal nos sistemas aquáticos. Numerosos estudos demonstraram que os metais pesados exercem um efeito tóxico mais importante a baixos valores de pH e que a toxicidade diminui a pH alcalino. Esta variação de toxicidade resulta de, em meio ácido, o metal se encontrar sob a forma iónica livre

enquanto que, em meio alcalino, prevalecer a tendência para formar hidróxidos e precipitar sob a forma de fosfatos e carbonatos (Rai e col., 1981). No entanto, outros estudos mostram que um aumento do valor de pH conduziu a um acréscimo de toxicidade, o que poderá ser devido à libertação de cobre por fenómenos inversos dos de adsorção. Peterson e col., (1984) mostraram que, para a alga *Scenedesmus quadricauda*, a toxicidade do cádmio e do cobre aumentava com o valor de pH. Para estes autores a variação da toxicidade do metal com o pH foi devida à competição, entre hidrogeniões e cátions metabólicos, para os locais de fixação celular.

A especiação de metais em solução é fortemente dependente da composição da água. As espécies inorgânicas ou as substâncias orgânicas, modificam a forma química do metal em solução e influenciam a sua toxicidade. Esta complexação torna o metal menos disponível para os organismos (Sunda e Lewis, 1978; Rai e col., 1981). Contudo, outros trabalhos mostram que, pelo contrário, nem sempre se verifica uma relação directa entre toxicidade-concentração em metal livre. Esta situação verifica-se, por exemplo, com as substâncias húmicas (Laegreid e col., 1983) cujo comportamento pode variar com a respectiva origem, podendo a sua complexação provocar um aumento, ou uma diminuição da toxicidade. Do mesmo modo, Winner (1984) num estudo sobre a toxicidade do cádmio e do cobre em presença de substâncias húmicas, verificou que a toxicidade aguda e crónica do cobre diminuiu enquanto que o cádmio tinha comportamento inverso.

Neubecker e Allen (1983) propuseram uma revisão dos métodos para avaliar os fenómenos de complexação, que a seguir se sintetiza:

- Modelização matemática, que permite simular a distribuição das espécies iónicas em função da concentração de ligandos e dos valores das constantes de estabilidade.
- Ensaio biológicos, utilizados para calcular as concentrações de iões metálicos livres tóxicos para a vida aquática, comparando a toxicidade dos metais antes e depois da adição de um agente complexante, de capacidade de complexação conhecida (Borgman, 1981).

- Troca iónica, utilizando resinas para determinar as constantes de estabilidade entre um metal e um ligando, funcionando a resina como um segundo ligando. O metal reparte-se segundo os valores das constantes do ligando e da resina. A importância da complexação é dependente da força das ligações metal-ligando e resina e das concentrações presentes no meio. Florence e Batley (1977) publicaram um esquema de especiação, no qual a diferenciação dos metais entre forma lábil e não lábil é feita após separação dos complexos por troca iónica.
- Métodos voltamétricos, que permitem medir pequenas quantidades de metal não complexado e determinar, electronicamente, as constantes de estabilidade dos complexos (polarografia impulsional, polarografia impulsional diferencial, polarografia de redissolução anódica).
- Eléctrodos específicos, para determinação da concentração de metal livre, permitindo, se se conhecer a concentração total de metal (por absorção atómica, por exemplo), calcular a proporção que foi complexada (Gardiner, 1974). A sensibilidade deste método não é muito elevada e a presença de outras substâncias em solução pode modificar a resposta do eléctrodo.

2.6 Toxicidade do cobre em relação aos organismos aquáticos

De uma maneira geral, a toxicidade dos elementos metálicos em relação ao meio aquático varia com diversos factores, dos quais se destacam, a forma sob a qual se encontra o elemento e as espécies "alvo". Embora a toxicidade de um metal varie de acordo com as suas espécies químicas, nenhuma é susceptível de poder ser considerada como universalmente tóxica, isto é, o que se aceita é que a toxicidade das diferentes espécies varie em função de um conjunto de circunstâncias, nomeadamente das características do meio aquático. Assim, a toxicidade é influenciada pelas características físico-químicas do meio, como por exemplo a temperatura, o pH, a dureza da água e o oxigénio dissolvido, dependendo ainda de efeitos sinérgicos e antagonistas decorrentes da presença de outros compostos minerais ou

orgânicos. (Miller e Mackay, 1980; Bradley e Sprague, 1985; Laurén e McDonald, 1986; Hutchinson e Sprague, 1987; Korwin-Kossakowsky, 1988)

Os organismos que vivem no meio aquático podem estar expostos a uma larga gama de concentrações de metal devido a mudanças sazonais que ocorram na composição da água, quer devido a escoamentos superficiais, quer pela deposição de material transportado pelo vento. Contudo, quantidades adicionais de cobre são constantemente fornecidas aos ecossistemas de água doce através de processos antropogénicos. Sendo a presença de cobre na água potencialmente tóxica para os organismos vivos, é importante conhecer os respectivos limites admissíveis, por forma a evitar que a contaminação de níveis tróficos inferiores tenha impacte noutros organismos da cadeia alimentar, ou que espécies com valor comercial se tornem impróprias para consumo.

Muitos organismos acumulam o cobre rapidamente. Quando em excesso, a sua eliminação pode efectuar-se através da superfície do corpo, pelas brânquias, ou por excreção para o intestino ou pela urina. Por outro lado, pode verificar-se a sua acumulação temporária ou permanente em tecidos, como por exemplo o fígado e o rim. (Segner, 1987; Khan e col., 1989; Daramola e Oladimeji, 1989). No entanto, alguns organismos aquáticos parecem capazes de regular a concentração de cobre, combinando processos de absorção, excreção e armazenamento. Esta capacidade pode ser avaliada pela análise de tecidos de organismos expostos a diferentes concentrações de cobre.

É bastante vasta a informação disponível sobre concentrações de cobre em organismos de água doce, circunstância que parece resultar da crescente preocupação acerca dos seus efeitos sobre os ecossistemas aquáticos, bem como do desenvolvimento de métodos analíticos para o quantificar.

Na Tabela 2.3 apresentam-se concentrações de cobre em alguns grupos de organismos de água doce (Harrison, 1986).

Tabela 2.3 - Concentrações de cobre em organismos de água doce

Organismo	Cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco)	Parte do corpo	Referência
Algae	11.6	Total	Anderson e Brower, 1978
Algae	12.6	Total	Anderson e Brower, 1978
Plancton	121-582	Total	Drbal e Budejovice, 1976
Algae	0.4-1.3	Total	Trollope e Evans, 1976
Algae	0.3-1.0	Total	Trollope e Evans, 1976
Algae	0.05-0.29	Total	Trollope e Evans, 1976
Salmonidea			
<i>Salvelinus fontinalis</i>	71.8	Fígado	Abo-Rady, 1979
<i>Salvelinus fontinalis</i>	0.575	Peixe inteiro	Abo-Rady, 1979
<i>Salvelinus fontinalis</i>	0.405	Músculo	Abo-Rady, 1979
<i>Salvelinus fontinalis</i>	70.5	Fígado	Abo-Rady, 1979
<i>Salvelinus fontinalis</i>	0.865	Peixe inteiro	Abo-Rady, 1979
<i>Salvelinus fontinalis</i>	0.98-3.62	Peixe inteiro	Giesy e Wiener, 1977
<i>Salvelinus fontinalis</i>	478.0	Fígado	Grizzle, 1981
<i>Salmo trutta</i>	3.0	Brânquias	Goette e col, 1974
<i>Salmo trutta</i>	5.7	Osso	Goette e col, 1974
<i>Salmo trutta</i>	442.0	Fígado	Goette e col, 1974
<i>trutta</i>	610.0	Fígado	Grizzle, 1981
<i>Salmo gairdneri</i>	21-28	Fígado	Lucas e col., 1970
<i>Salmo gairdneri</i>	135.0	Fígado	Grizzle, 1981
<i>Salmo gairdneri</i> e <i>Salmo trutta</i>	76-287	Fígado	Wilson e col., 1981
Cyprinidae			
<i>Cyprinus carpio</i>	4.9	Músculo	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Cyprinus carpio</i>	9.8	Brânquias	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Cyprinus carpio</i>	16.3	Fígado	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Cyprinus carpio</i>	5.9	Peixe inteiro	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Cyprinus carpio</i>	29.0	Osso	Wong e Kwan, 1981
<i>Cyprinus carpio</i>	45.0	Vísceras	Wong e Kwan, 1981
<i>Cyprinus carpio</i>	81.0	Vísceras	Muramoto, 1981
<i>Cyprinus carpio</i>	21.0	Brânquias	Muramoto, 1981
<i>Tinca tinca</i>	5.7	Músculo	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Tinca tinca</i>	14.3	Brânquias	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Tinca tinca</i>	39.5	Fígado	Drbal e Budejovice, 1976
<i>Tinca tinca</i>	5.7	Peixe inteiro	Drbal e Budejovice, 1976

(Harrisson, 1986)

As quantidades de cobre num dado organismo estão relacionadas com a concentração e forma físico-química em que se encontra no meio ambiente, a duração e vias de exposição, bem como com a capacidade do organismo para regular o respectivo transporte através de superfícies críticas do corpo. Como as concentrações do cobre

dependem de muitos factores, podem registar-se diferenças consideráveis entre organismos de uma mesma espécie recolhidos em locais distintos, ou do mesmo local se tiverem tempos de exposição diferentes.

2.6.1 Microrganismos

A microflora de águas doces, principalmente bactérias, desempenha um papel muito importante nos processos de autodepuração e de eutrofização dos cursos de água.

Concentrações da ordem de 0.1 a 0.5 mg.l⁻¹ são tóxicas para bactérias e outros microrganismos (Water Quality Criteria, 1973), enquanto que na faixa de 0.01 a 5.0 mg.l⁻¹ interferem com o processo de autodepuração dos cursos de água. Uma concentração de 8.4 mg.l⁻¹ de Cu²⁺, pode reduzir de 50% a Carência Bioquímica de Oxigénio, em 5 dias (Mackee e Wolg, 1963).

Hobson e Shaw (1976) analisaram o efeito do cobre na produção de metano pela bactéria *Methanobacterium formicicum*, verificando que a fermentação é inibida com uma concentração de 300 mg.l⁻¹. Os referidos autores sublinham, no entanto, que o meio de cultura contém uma determinada quantidade de sulfureto de sódio, susceptível de precipitar uma parte do cobre adicionada ao meio. Para estes autores a concentração activa do cobre seria apenas da ordem de 46 mg.l⁻¹.

Constata-se assim que a acção do cobre varia segundo as espécies e o mecanismo fisiológico considerado.

2.6.2 Algas e Plantas Aquáticas

As propriedades fitotóxicas do cobre são conhecidas desde o início deste século, sendo utilizado, na forma de sulfato, para o controlo de crescimento de algas, a concentrações da ordem de 0.01 a 1 mg.l⁻¹ (Gachter e col., 1973). Com efeito, com uma concentração de 0.1 mg.l⁻¹ Cu²⁺, a fotossíntese de uma alga gigante *Macrocystis pyrifera* reduz-se 50% entre 2 a 5 dias, e 70%, entre 7 a 9 dias, sendo observadas lesões

após 10 dias (Water Quality Criteria, 1973). Por outro lado, a concentração referida (obtida a partir do nitrato de cobre) é considerada uma dose letal para a diatomácea *Synedra ulna* (Rizet, 1977).

No caso de *Chlorella vulgaris*, o seu crescimento é consideravelmente reduzido na presença de concentrações de cobre entre 0.2 e 0.3 mg.l⁻¹ (Yong e Lisk, 1972), embora seja estimulado com concentrações da ordem de 0.03-0.04 mg.l⁻¹ (Manaham e Smith, 1973).

Verifica-se, portanto, que os efeitos do cobre variam consoante a concentração no meio, actuando como um oligoelemento necessário, ou implicando inibição quando presente em teores elevados.

2.6.3 Peixes

Como já foi referido anteriormente, constata-se uma grande variação de valores de concentrações de cobre consideradas tóxicas para peixes. Certos estudos mostram que concentrações compreendidas entre 0.1 e 1.0 mg.l⁻¹ não são tóxicas, ao contrário de outros que consideram que a toxicidade se verifica na faixa de 0.015 a 3 mg.l⁻¹, particularmente em águas de baixa dureza.

Na Tabela 2.4 apresentam-se valores de concentrações letais de cobre para algumas espécies de peixes, para uma água de dureza igual a 250 mg.l⁻¹ em CaCO₃ e para uma exposição de dez dias.

Tabela 2.4 - Concentrações letais de cobre em diferentes espécies de peixes

Espécies	CL 50 - 10 dias (mg.l ⁻¹ Cu)
Enguia	4.00
Truta arco-íris	0.80
Lúcio	2.00
Carpa comum	0.18
Perca	0.13

(Adaptado de "Fish and Water Quality Criteria", 1974)

Verifica-se uma variação intra-específica relativamente grande em que a enguia parece ser a mais resistente sendo a perca a mais sensível.

Por outro lado os resultados de Shaw e Brown (1974) relativos ao estudo da influência do pH sobre a toxicidade do cobre para a truta arco-íris, mostram que embora a concentração letal seja semelhante para valores de pH 6.5 e 7.5, pelo contrário, o tempo de sobrevivência a pH 7.5 era nitidamente mais elevado. Assim, o valor de pH influenciaria principalmente o tempo letal, o que parece poder aplicar-se apenas à faixa de valores estudada, visto que o pH do meio é um dos factores que determinam as espécies iónicas presentes, cuja toxicidade não é uniforme.

A presença de matéria orgânica reduz também a toxicidade do cobre, como se verifica pelos resultados de Brown e col., (1974). Comparando a toxicidade do metal para a truta arco-íris em diversos meios (água residual, água+animoácidos, água+substâncias húmicas, água+matéria orgânica em suspensão), constataram uma redução de toxicidade em relação ao teste biológico utilizando uma água desprovida de matéria orgânica. Esta variação de toxicidade deverá resultar da complexação do cobre com substâncias orgânicas, substâncias húmicas, etc, de que resulta uma redução da concentração em cobre solúvel.

Segundo Calamari e Marchetti (1973), a influência de detergentes na toxicidade do cobre para a truta arco-íris, varia de acordo com o seu tipo, isto é, os aniónicos têm um efeito sinérgico, enquanto que os não iónicos produzem um efeito antagonista.

A toxicidade do cobre pode interferir nos mecanismos de osmorregulação (Courtois, 1976), verificando-se que nos peixes de água doce há uma diminuição da concentração em Na^+ do soro, após a intoxicação, enquanto que nos peixes de água salgada, pelo contrário, há um aumento daquela concentração. Laurén e McDonald (1985, 1986, 1987) confirmaram a inibição da assimilação de sódio, na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), a partir de uma concentração de cobre de $12.5\mu\text{g.l}^{-1}$.

O sexo e o tamanho constituem factores adicionais para a análise da toxicidade do cobre para peixes. Tsai e Chang (1981) expuseram alevins de guppy (*Lebistes reticulatus*), machos e fêmeas, a várias soluções de cobre, constatando que os efeitos decresciam com o aumento do peso dos peixes, sendo pouco significativa a diferença entre a resposta dos machos e das fêmeas, a qual só foi possível detectar introduzindo o factor peso.

Por outro lado, Drummond e col. (1973) demonstraram que o comportamento alimentar da espécie *Salvelinus fontinalis* se alterava em função do período de exposição ao cobre. Com efeito, após exposições de 2 a 24h e a concentrações de cobre da ordem de 6-15 $\mu\text{g.l}^{-1}$, observaram uma diminuição do consumo de alimento.

Alterações de comportamento dos peixes, como a hiperactividade, têm sido relacionadas com exposição subletal a metais pesados, como se verificou em algumas espécies, para níveis de 0.1 a 0.2 mg.l^{-1} de cobre (Scarfe e col., 1982; Steele, 1983a, 1985 a).

Na Figura 2.5 apresenta-se a relação entre as concentrações limiares de cobre e alguns efeitos que este metal induz em peixes de água doce.

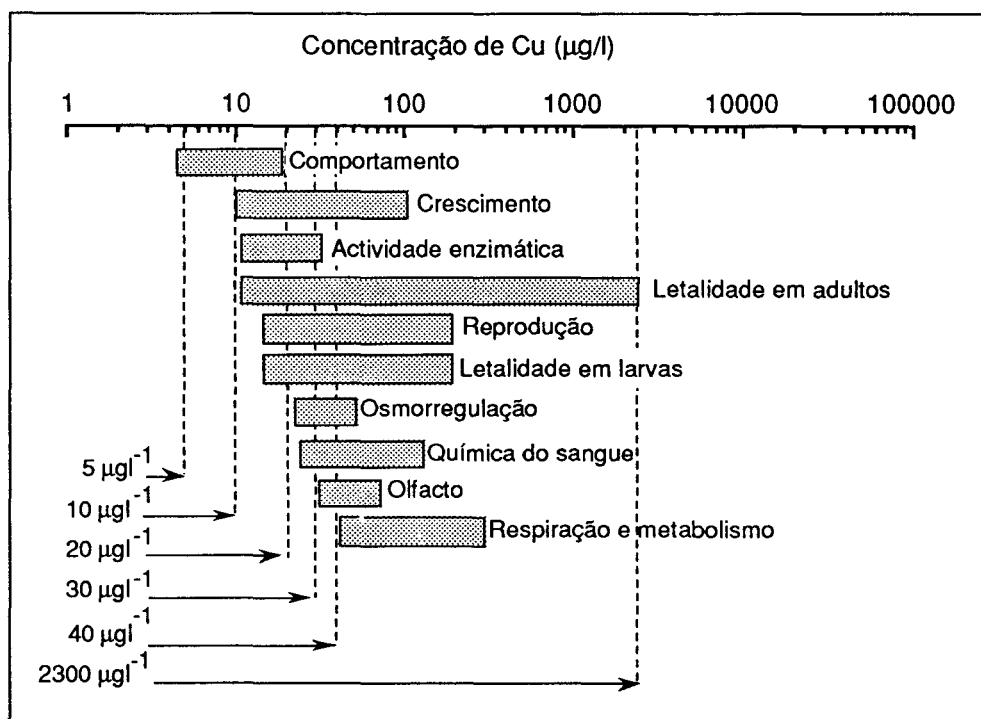


Figura 2.5. -Efeitos do cobre em peixes de água doce (concentrações limiares)
(Adaptado de Spear e Pierce, 1979)

2.7 Influência de factores abióticos e bióticos sobre a toxicidade do cobre

2.7.1 Factores abióticos

A toxicidade do cobre, e de um modo geral a de outros elementos e produtos considerados tóxicos, é consideravelmente influenciada por condições ambientais que, para além de determinarem a forma em que o tóxico se encontra, podem condicionar a resposta dos organismos. Assim, revêem-se os principais factores abióticos relativamente à toxicidade do cobre para peixes.

2.7.1.1 Temperatura

A temperatura, para além de constituir um factor limitante da sobrevivência dos organismos aquáticos, influencia a velocidade dos processos metabólicos, incluindo a absorção, o metabolismo e a excreção de tóxicos. O aumento da toxicidade dos metais pesados com a elevação da temperatura pode ser explicado por um acréscimo de actividade respiratória (Lloyd, 1965) e portanto uma maior absorção branquial. Assim, as espécies *Pimephales promelas* e *Salmo gairdneri*, quando expostas a uma concentração de 0.01 mg.l^{-1} de Cu^{2+} , sobreviveram por períodos de tempo 2.2 e 3.6 vezes mais longos, quando a temperatura baixa de 24° para 18°C e de 16° para 10°C , respectivamente (Biergert e Valkovic, 1980). De igual modo, algumas propriedades do tóxico podem ser directamente influenciadas pela temperatura, como por exemplo, através de alterações do equilíbrio entre formas moleculares e ionizadas. Sprague (1970) admite mesmo que o estudo do efeito da temperatura, para a determinação de concentrações letais limite (CL 50), seja mais importante do que os períodos de tempo de observação arbitrariamente seleccionados. Isto porque a temperatura pode influenciar a velocidade de reacção do organismo para o tóxico, não alterando a concentração letal limite. No entanto, parece ser generalizadamente aceite que o tempo de reacção dos organismos a uma dada concentração de tóxico é muito reduzido para elevadas temperaturas (Cairns e col., 1975).

2.7.1.2 Oxigénio dissolvido

Tal como a temperatura, o oxigénio dissolvido é um factor vital para os organismos aquáticos, devido aos seus processos metabólicos. O estudo da exposição de trutas ao cobre, a teores variáveis de oxigénio, revela um aumento da toxicidade quando a percentagem de saturação em oxigénio da água diminui, pois o ritmo de ventilação é superior (Lloyd, 1965). No entanto, a aclimação prévia dos peixes a baixas concentrações de oxigénio, pode reduzir parcialmente aqueles efeitos (Adelman e Smith, 1972).

Por outro lado, a concentração de oxigénio na água, bem como a temperatura, para além das alterações fisiológicas que podem provocar nos organismos, condicionam processos químicos (por exemplo, oxidação-redução) que modificam a disponibilidade dos metais.

2.7.1.3 pH

Apesar de valores extremos de pH serem prejudiciais para os organismos aquáticos, a faixa compreendida entre 5 e 9 é aceitável para a maior parte das espécies de peixes (EIFAC/FAO, 1976), considerando-se como faixa óptima, os valores entre 6.5 e 8.5, embora Fromm (1980) admita que a maior parte das espécies tolera valores de pH 5.0.

No entanto em águas com pH ácido, têm-se verificado efeitos diversos, desde elevadas mortalidades de larvas (Daye e Garside, 1980; Peterson e col., 1980), inibição do crescimento (Leivestad e col., 1976; Nelson, 1982) e modificações do fígado e do epitélio intestinal (Shrivastava e Dwivedi, 1979), bem como do coração, rim e cérebro (Daye e Garside, 1980). A oogénese pode ser adversamente afectada (Lee e Gerking, 1980), podendo também verificar-se a inibição da espermatogénese (Rubi e col., 1978). Peterson e col., (1980) observaram uma elevada mortalidade dos ovos fertilizados e anomalias no desenvolvimento embrionário em salmonídeos, tendo Lee e Gerking (1980) observado efeitos idênticos em ciprinídeos.

Apesar disto, e embora tendo em conta variações de resposta das diferentes espécies, a resistência a baixos valores de pH pode aumentar com a idade (Kwain, 1975; Leivestad e col., 1976; Lee e Gersing, 1980), ou com o tamanho dos organismos, como verificaram Robinson e col., (1976), com a espécie *Salvelinus fontinalis*.

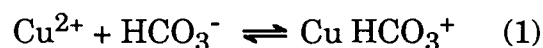
No caso da carpa, e de acordo com os resultados obtidos por Korwin-Kossakowski (1988) nos estudos que efectuaram sobre o seu desenvolvimento larvar, a duração dos estádios de desenvolvimento e a mortalidade não são afectadas para valores de pH entre 6.0 e 6.4. No entanto, para valores de pH 5.0-5.5 registaram uma duração superior dos estádios de desenvolvimento e também um aumento de mortalidade em relação aos indivíduos "testemunha". Este estudo considera que o limite crítico inferior do valor de pH para larvas de carpa, é aproximadamente 5.0-5.2. Com efeito, para estes valores foi não só observada a inibição do crescimento, como também mortalidades elevadas.

2.7.1.4 Dureza

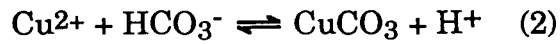
A dureza é um dos parâmetros característicos da água que intervem na toxicidade dos metais pesados, sendo aceite que em águas de elevada dureza os efeitos tóxicos dos metais são comparativamente menores do que os que se observam em águas macias.

De um modo geral, em águas naturais, a durezas elevadas correspondem igualmente alcalinidades significativas e, conseqüentemente, reduções da concentração de formas iónicas livres, normalmente mais tóxicas. Assim, a toxicidade está directamente ligada à solubilidade do metal, que depende da concentração em iões bicarbonatos.

No caso do cobre, são os seguintes os equilíbrios entre os iões Cu^{2+} e bicarbonato (Scaife, 1957):



sendo a constante de equilíbrio $K_1 = \frac{[\text{CuHCO}_3^+]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{HCO}_3^-]}$



$$\text{donde } K_2 = \frac{[\text{CuCO}_3] [\text{H}^+]}{[\text{Cu}^{2+}] [\text{HCO}_3^-]}$$

Combinando as equações (1) e (2) tem-se:

$$[\text{Cu}_T] = [\text{Cu}^{2+}] + [\text{CuCO}_3] + [\text{CuHCO}_3^+]$$

$$[\text{CuHCO}_3^+] + [\text{CuCO}_3] = [\text{Cu}_T] - [\text{Cu}^{2+}]$$

$$K_1 + \frac{K_2}{[\text{H}^+]} = \frac{[\text{Cu}_T] - [\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}] [\text{HCO}_3^-]}$$

sendo $[\text{Cu}_T]$ a concentração de cobre total.

Este equilíbrio dependente do pH, permite a representação gráfica de $\frac{[\text{Cu}_T] - [\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}] [\text{HCO}_3^-]}$ em função dos valores de $\frac{1}{[\text{H}^+]}$ como se mostra na Figura 2.6.

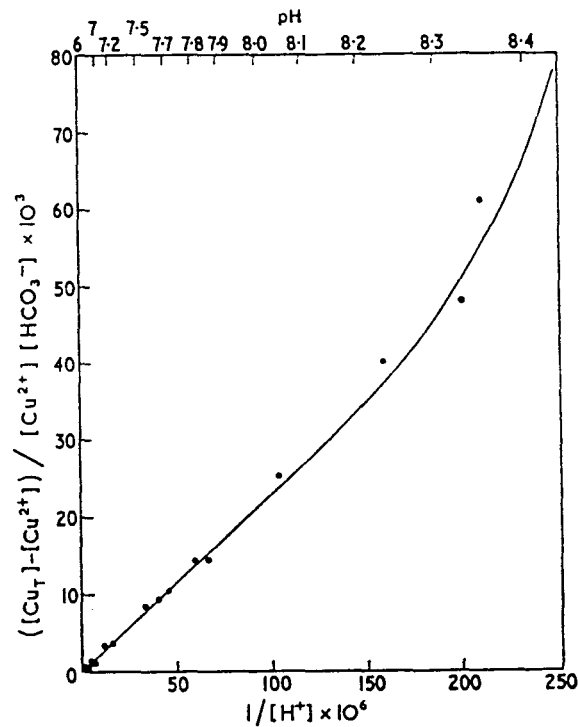


Figura 2.6 - Equilíbrio cobre/bicarbonato numa solução contendo 5×10^{-3} M de bicarbonato de sódio (Adaptado de Stiff, 1971)

Em solução, o cobre está sob a forma iônica livre Cu^{2+} (solúvel) e sob uma forma insolúvel (CuCO_3) com libertação de um ião de hidrogênio, dependendo essencialmente da concentração em bicarbonato.

Numa água dura, o cobre é complexado sob a forma de CuCO_3 , variando portanto a sua disponibilidade em relação aos organismos aquáticos, com redução de toxicidade.

Seguidamente descreve-se, resumidamente, o trabalho de Brungs e col. (1976) que exemplifica a influência da dureza sobre a toxicidade do cobre. Os referidos autores observaram que as concentrações letais de cobre total e dissolvido para a espécie *Phoxinus phoxinus* variavam com a dureza da água, como se indica na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Concentrações letais de cobre total e dissolvido para *Phoxinus phoxinus*

Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	LT 96h (limite de tolerância em mg.l ⁻¹)	
	Cobre total (CuT)	Cobre dissolvido (Cu ²⁺)
148	1.6	0.60
360	21.0	0.98

Como se pode verificar, com o acréscimo da dureza total de 148 para 360 mg.l⁻¹ (CaCO₃), o LT 96h aumentou de forma importante para o cobre total, embora tendo uma variação pouco significativa, para o cobre dissolvido. Tendo em conta a fraca variação do LT 96h do cobre dissolvido, é de presumir que a maior parte do metal se encontrava complexado sob uma forma insolúvel, o que explica o aumento importante do LT 96h do cobre total.

Resultados semelhantes indicando que a toxicidade do cobre para peixes decresce com a dureza, foram obtidos por diversos autores (Shaw e Brown, 1974; Zitko e Carson, 1976; Howarth e Sprague, 1978; Chakoumakos e col., 1979; Miller e Mackay, 1980; Sprague, 1985). Lloyd (1960) verificou que a concentração letal de zinco para a truta

arco-íris (*Salmo gairdneri*) em dois dias e meio, variava de um factor de oito, para uma dureza variando entre 12 e 320 mg.l⁻¹ em CaCO₃.

A dureza pode portanto considerar-se como um "indicador" importante da disponibilidade de metais em solução. Por outro lado, a acumulação de metais pesados em peixes é mais importante em águas macias do que em águas duras (Winner e Giesy, 1979), tendo a dureza, e especialmente o cálcio, um papel essencial na tolerância dos peixes para águas com pH ácido (Nelson, 1982; McWilliams, 1982; Mc Donald, 1983). Efectivamente, vários estudos demonstram que o cálcio afecta a permeabilidade das brânquias nos peixes (Potts e Fleming, 1971; Cuthbert e Maetz, 1972), sendo também admitido que o cálcio pode competir com os metais para os mesmos locais nos tecidos dos peixes, podendo este ser outro mecanismo que contribui para os efeitos da dureza na letalidade dos metais (Pagenkopf, 1983; Reid e McDonald, 1991).

2.7.2 Factores bióticos

A susceptibilidade dos animais a produtos tóxicos pode manifestar-se por variações interespecíficas e intra-específicas. Efectivamente, para além das condições ambientais, a resposta dos organismos à acção de produtos tóxicos é influenciada pelas suas características biológicas.

Para uma dada espécie, a comparação de níveis de toxicidade só será significativa se as condições no meio forem idênticas, o que, do ponto de vista de execução de testes, implica reproduzir em ambientes eventualmente diferentes, as mesmas condições experimentais. Devem portanto salientar-se as dificuldades que daí resultam, podendo até admitir-se que, normalmente, algumas variáveis importantes não sejam sequer consideradas. Apesar disso, no caso dos peixes, as variações interespecíficas parecem ser inferiores às que resultam das condições ambientais.

Diversos estudos (Sprague, 1970; Hermanutz e col., 1973; Smith e col., 1978) mostraram que as variações interespecíficas, avaliadas pelas CL 50 de várias espécies de peixes e para diferentes poluentes, podem

atingir amplitudes diversas, cujo intervalo característico se considera até três a quatro vezes o valor mínimo detectado. Por outro lado, os trabalhos de Ball (1976a), relacionando limiares de concentração letal com CL 50, mostraram que este último parâmetro de toxicidade pode ser menos significativo do que o primeiro, conduzindo a variações interespecíficas mais elevadas. Smith e col., (1978) no seu estudo sobre toxicidade de cianeto para peixes, mostram que a variação introduzida por condições ambientais pode ser idêntica à que resulta das variações interespecíficas.

Algumas espécies, embora tendo CL 50 idênticas, podem apresentar variações individuais de susceptibilidade ao tóxico (Ball, 1976 a). Nestes casos, a utilização do valor de CL 50 isoladamente, isto é, sem qualquer informação sobre a evolução de toxicidade até àquele limite, pode implicar interpretações errôneas de níveis de perigosidade ou de estimativas de efeitos.

Análises semelhantes à que foi descrita para peixes, foram efectuadas para diversos invertebrados e diferentes tóxicos, conduzindo a conclusões semelhantes. Embora seja difícil concluir com rigor sobre a susceptibilidade dos organismos e as suas variações interespecíficas, dada a natureza biológica do material utilizado nos testes de toxicidade e, também, a multiplicidade de variáveis envolvidas na sua realização, parece evidente a necessidade de acompanhar a evolução dos processos ou estados de qualidade daqueles testes, se se pretender interpretar significativamente o seu resultado.

A susceptibilidade dos organismos para tóxicos pode ainda advir de variações intra-específicas, considerando-se que o tamanho e a idade, no caso dos peixes, sejam as variáveis mais significativas. Diversos estudos (Adelman e col., 1976; Chapman, 1978; Kumaguru e Beamish, 1981), entre outros, têm-se debruçado sobre a influência das variações intra-específicas na avaliação da toxicidade, não sendo possível extrair conclusões definitivas, embora se evidenciem diferenças significativas relativamente à influência das variáveis referidas na toxicidade. O problema pode mesmo colocar-se a nível genético, confundindo por vezes a resistência por adaptação genética com processos de aclimação. Com efeito, a "história" do material biológico pode

determinar comportamentos e respostas diferentes para condições de toxicidade (físicas e químicas) idênticas.

2.8 Mecanismo de defesa nos peixes

Face a agressões externas, os organismos vivos manifestam uma reacção de defesa. Em caso de contaminação por elementos metálicos, os peixes "detectam" rapidamente a presença do tóxico no seu meio, tendo reacções comportamentais ou metabólicas. Estas reacções traduzem-se, muitas vezes, quer por uma diminuição das trocas com o meio exterior, quer por síntese de metaloproteínas nos órgãos "alvo", ou muito simplesmente, por excreção do excesso de tóxico.

2.8.1 Metaloproteínas (MP)

Distinguem-se duas categorias de metaloproteínas, que diferem tanto pelas suas propriedades físico-químicas e bioquímicas, como pelas suas funções metabólicas no organismo: as metalotioninas e as metaloproteínas não metalotioninas.

- **Metalotioninas (MT)**

As metalotioninas são proteínas que sequestram metais dos grupos 1B e 2B da tabela periódica de elementos, principalmente o cádmio, o cobre, o mercúrio e o zinco. Distinguem-se das outras metaloproteínas, por três propriedades fundamentais (Margoshes e Vallee, 1957):

- baixo peso molecular: cerca de 10.000;
- composição em aminoácidos ricos em cisteína (da ordem dos 30% dos resíduos ácidos aminados) e desprovidas de ácidos aromáticos e de histidina;
- espectro de absorção em ultra violeta a 250 nm.

As metalotioninas encontram-se largamente repartidas no reino animal e vegetal. Numerosos trabalhos têm sido dedicados ao seu estudo com o

objectivo de determinar a sua função "normal" e o seu metabolismo (Onosaka e col.,1984; Engel, 1987).

A função última das metalotioninas é ainda desconhecida, mas é normalmente aceite que a função primária seja o metabolismo homeostático de metais essenciais como o cobre e o zinco (Brady, 1982; Karin, 1985).

Admite-se que as metalotioninas têm um papel protector contra os efeitos tóxicos daqueles metais, sequestrando e reduzindo a quantidade de metal livre nos tecidos, reduzindo assim a respectiva toxicidade potencial (Bouquegneau e col., 1975; Cherian e Goyer, 1978).

Assim, as metalotioninas permitem aumentar a tolerância dos organismos expostos a metais, quer fixando o excesso metálico a nível da mucosa intestinal, se a contaminação for por via oral, quer imobilizando esse excesso a nível hepático, sanguíneo ou renal, se a contaminação for directa (Bradley e col.,1985; Viarengo e col., 1987). Neste caso, apesar da concentração de metal na célula poder ser anormalmente elevada, a sua presença verifica-se sob uma forma não tóxica, isto é fixados às tioninas neo-sintetizadas. Apenas no caso em que o fluxo de metais que entra na célula excede a quantidade das metalotioninas sintetizadas, é que se verifica toxicidade celular.

Contrariamente ao papel toxicológico e fisiológico favorável das metaloproteínas, do ponto de vista ecológico, deve-se-lhes atribuir um papel nefasto, na medida em que, favorecendo a fixação dos metais pelos organismos, portanto a sua acumulação, aumentam o risco de contaminação dos animais que ocupam os níveis superiores das cadeias alimentares. As metalotioninas são pois factores que aumentam a biomagnificação.

Nos peixes, as metalotioninas distribuem-se principalmente por tecidos como as brânquias, fígado, rins e intestino, podendo também encontrar-se, no sangue, em pequenas quantidades (Noel-Lambot e col.,1978; Reichert e col.,1979; Kito e col.,1982 b).

Vários investigadores sugerem que as metalotioninas podem constituir um potencial indicador biológico da pressão ambiental, resultantes da contaminação de populações animais por metais (Olafson e col., 1979b; Shaikh e Hirayama, 1979).

Uma vez que as metalotioninas são induzidas nos organismos aquáticos, vertebrados e invertebrados, Olafson e col., (1979 b) admite que a quantidade de metalotioninas, constitui uma medida aceitável da exposição a metais, a qual é referida por Neff (1985) como "índice de exposição".

3. TESTES DE TOXICIDADE

3.1 INTRODUÇÃO

A toxicologia aquática tem sido definida como sendo o estudo dos efeitos de produtos químicos e de outros agentes sobre os organismos, especialmente no que se refere aos efeitos adversos ou nocivos (Ramade, 1977).

A toxicidade de um determinado poluente, relativamente a uma comunidade biológica específica, avalia-se pelos efeitos da sua presença no meio, podendo prever-se, sempre que exista informação, apenas a partir do conhecimento do teor em que o poluente se encontra no meio. Assim, através de estudos de "causa-efeito", "poluente-comunidade biológica", é possível determinar níveis de perigosidade para um determinado poluente e para um determinado organismo, surgindo deste modo procedimentos normalizados, designados por testes biológicos.

A utilização de um teste biológico para determinar os perigos potenciais, ou a toxicidade de um produto, parece ser a solução mais eficaz e mais precisa (Barbier e col., 1974), visto que permite estimar a mortalidade provocada por um composto tóxico em condições experimentais normalizadas, sobre uma amostra de população de uma espécie de referência, permitindo assim avaliar as diferentes formas de toxicidade de uma determinada substância.

Podem distinguir-se dois tipos de estudos para determinar a toxicidade de produtos lançados no meio natural:

- testes normalizados;
- ensaios biológicos.

Esta classificação põe em evidência uma diferença fundamental entre os dois tipos de estudo: o ensaio biológico permite conhecer a causa da toxicidade de um produto, enquanto que o teste normalizado apenas comprova a sua toxicidade.

Os testes normalizados podem ser utilizados com espécies animais ou vegetais e permitem avaliar a toxicidade de produtos químicos, isolados ou em misturas, como no caso de efluentes domésticos ou industriais. Visam determinar teores máximos admissíveis dos poluentes, a fixar por normas de descarga, não fornecendo qualquer interpretação sobre a respectiva toxicidade. Apesar disso, tratando-se de testes padronizados, permitem comparar níveis de toxicidade, o que se considera de grande utilidade para o estudo de disfunções ambientais.

Neste sentido, a I.S.O. (International Standardizing Organisation) tem desenvolvido e adoptado testes que possam ser aplicados em qualquer região, por forma a maximizar a sua utilidade.

Os ensaios biológicos utilizam um sistema vivo para avaliar o efeito de uma variável do meio ambiente (Warner, 1967), com o objectivo de determinar:

- qualidade e quantidade de uma substância ou produto presente no meio;
- importância da modificação que atinge o sistema.

O teste normalizado é pois um ensaio biológico de tipo particular: as condições experimentais são rigorosamente estabelecidas e imutáveis, representando portanto uma simplificação extrema do meio aquático.

Os testes de toxicidade são utilizados para avaliar concentrações de produtos químicos e duração de exposição necessárias para produzir um efeito crítico. Estes testes, constituem um valioso instrumento na detecção e avaliação de efeitos toxicológicos potenciais de produtos químicos, nos organismos aquáticos, não sendo os efeitos necessariamente nocivos. Os seus resultados permitem obter informação essencial para a avaliação de riscos associados à situação em que o agente químico, o organismo, e as condições de exposição são bem definidas. Para que um teste possa ser considerado normalizado, são exigidos alguns critérios (ASTM E 729-80, 1980 a), nomeadamente:

- ser amplamente aceite pela comunidade científica;
- ter capacidade para predizer efeitos de uma grande gama de produtos químicos, em diferentes organismos;
- basear-se em procedimentos com vasta base estatística e grande reprodutibilidade;
- ser pouco dispendioso e de fácil realização;
- ter sensibilidade adequada à detecção de efeitos.

3.1.1 Tipo de espécies utilizadas nos testes

Os testes de toxicidade socorrem-se, normalmente, de espécies de que se dispõe de ampla informação sobre o seu comportamento face a agentes tóxicos. Aquelas espécies podem ser recolhidas de populações existentes em áreas despoluídas, criadas em laboratório, ou mesmo adquiridas em fornecedores especializados.

Para um determinado teste, ou para testes que se pretendam relacionar, as espécies deverão ter sempre a mesma origem, para que se mantenha a representatividade dos resultados. Assim, para maximizar a aproximação dos testes às condições naturais, é usual empregarem-se espécies indígenas. Por outro lado, para além das dificuldades que resultariam da imposição de determinada espécie, o interesse dos resultados poderia ser reduzido para as condições relativas ao local em que o teste se realizasse.

A definição de agentes biológicos para avaliação de toxicidade é bastante problemática, dadas as diferenças de sensibilidade dos organismos utilizados. Relativamente ao cobre, em função dos pCu, sintetiza-se na Figura 3.1 a toxicidade para diferentes organismos, utilizando resultados de diversos autores (Nor, 1987).

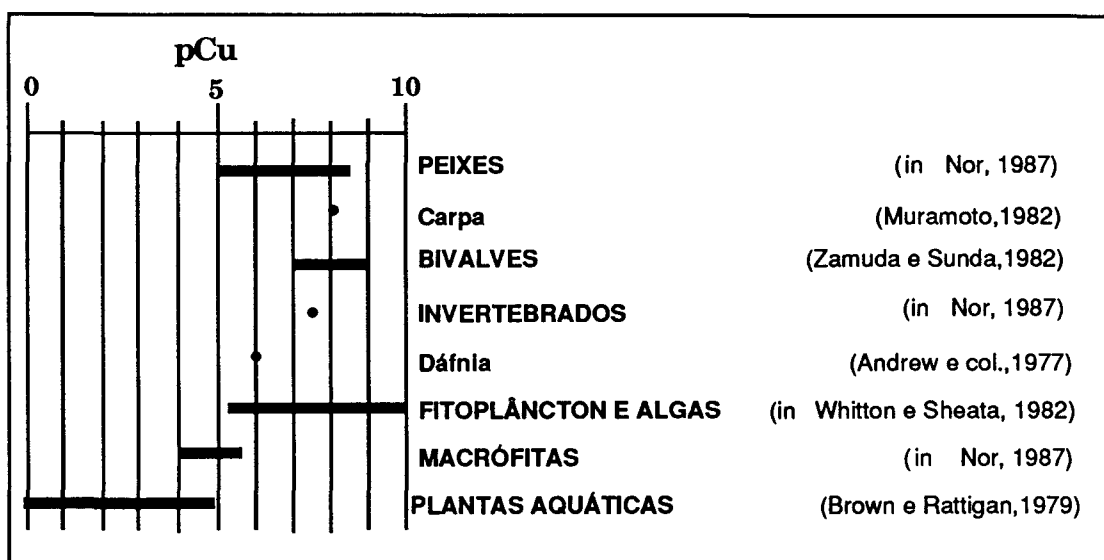


Figura 3.1 - Níveis de toxicidade do cobre para diferentes organismos

Da análise da Figura 3.1 constata-se que os níveis de toxicidade são muito variáveis, o que parece vir a conduzir à utilização de testes com mais do que um tipo de organismo.

3.1.2 Formas de exposição

Nos testes de toxicidade aquática, consideram-se quatro formas para exposição dos organismos à solução aquosa contendo o tóxico (USEPA, 1980, APHA, AWWA, and WPCF, 1981; Buikema e col., 1982), como seguidamente se descreve.

3.1.2.1 Teste estático

Neste tipo de teste os organismos são expostos em água não renovada, à qual foi adicionado o produto a testar em quantidade correspondente à concentração desejada.

3.1.2.2. Teste com recirculação

É um teste semelhante ao estático, em que se procura manter a qualidade da água recirculando-a através de dispositivos de apoio, como

filtros, mantendo-se a concentração do produto a testar. Este tipo de teste não é muito utilizado pois é muito dispendioso, quer devido à montagem, quer pela manutenção que exige. Para além destes inconvenientes colocam-se também dúvidas, relativamente a eventuais efeitos dos dispositivos de apoio no produto a testar (Rand e Petrocelli, 1985).

3.1.2.3 Teste com renovação (semi-estático)

Trata-se de um teste também semelhante ao estático, portanto sem recirculação contínua, mas com renovações periódicas de água (normalmente a intervalos de 24 ou 48 horas).

3.1.2.4 Teste dinâmico

Neste teste a água com o produto a testar, flui através do tanque em que se encontram os organismos, podendo ser utilizado com um sistema intermitente ou contínuo.

O teste "estático" e o "dinâmico" são os mais utilizados em toxicidade aguda (Rand e Petrocelli, 1985). Apesar da técnica do teste estático ser a mais fácil e menos dispendiosa, apresenta, no entanto, algumas desvantagens:

- o produto a testar pode ser degradado e, ou volatilizado, adsorvido nas paredes dos tanques ou dos próprios organismos, ou sofrer outra modificação, implicando que as concentrações a que os organismos estão expostos decresçam com a progressão do teste;
- o produto a testar pode ter uma elevada carência bioquímica de oxigénio (CBO) e a toxicidade pode ser mascarada, devido ao esgotamento de oxigénio dissolvido;
- os produtos metabólicos dos organismos podem vir a reagir com o produto a testar, podendo conduzir a uma alteração da sua resposta.

Se nenhuma das condições mencionadas for muito significativa, o resultado do teste estático pode, apesar de não ter uma precisão muito elevada, fornecer informação suficientemente representativa sobre os efeitos do produto a testar.

3.1.3 Descrição dos métodos utilizados nos testes de toxicidade

Os métodos utilizados em testes de toxicidade aquática podem classificar-se de acordo com os seguintes factores: tempo de exposição, condições de realização do teste, critérios de efeitos a ser avaliados, tais como, sobrevivência, reprodução, comportamento de organismos e organismos a ser testados.

Os dados produzidos nestes testes permitem a determinação da concentração sem efeito observável (NOEC-"No Observed Effect Concentration") ou a concentração sem efeito ("No Effect Concentration") que corresponde à concentração máxima do produto a testar que não produz efeitos nocivos, estatisticamente significativos, nos organismos do teste, quando comparados com os organismos do teste "testemunha".

A menor concentração com efeito observável (LOEC-"Lowest Observed Effect Concentration") ou concentração limiar mínima (MTC-"Minimum Threshold Concentration"), também pode ser obtida, correspondendo portanto à menor concentração que provoca efeitos nocivos, estatisticamente significativos, nos organismos do teste, quando comparados com os organismos do teste "testemunha".

Através dos testes de toxicidade é ainda possível estimar a concentração máxima aceitável de tóxico (MATC-"Maximum Acceptable Toxic Concentration"), isto é, a concentração limiar no início do teste, cujo valor se situa no intervalo compreendido entre a concentração mais elevada, que não provoca efeitos prejudiciais significativos e a mais baixa concentração a que se observam efeitos nocivos significativos (LOEC) (Mount e Stephan, 1967). Assim, tem-se:

$$\text{NOEC} < \text{MATC} < \text{LOEC}$$

A informação obtida com testes de toxicidade tem entre outras as seguintes finalidades (USEPA, 1980):

- apoio à decisão para o desenvolvimento, manufactura e comercialização de produtos;
- registo de produtos;
- verificação de qualidade da água e de descargas de efluentes domésticos e industriais;
- apoio à resolução de conflitos, entre entidades industriais afins, resultantes de alterações provocadas no meio ambiente.

Embora os testes de toxicidade constituam apenas um dos instrumentos utilizados pelos toxicologistas, a informação que fornecem permite considerá-los como um meio básico para a obtenção de estimativas rápidas e reprodutíveis de efeitos tóxicos, a custos relativamente acessíveis. Constituem, portanto, um método indispensável à toxicologia aquática (Rand e Petrocelli, 1985).

3.2 Testes de toxicidade aguda: CL 50-48h

Os testes de toxicidade aguda têm por objectivo determinar a concentração de um produto (por ex. um produto químico ou um efluente), ou variações de um parâmetro (por ex., temperatura ou pH), que produz efeitos nocivos num grupo de organismos, durante um período de exposição curto, em condições determinadas.

Apesar destes testes poderem ser conduzidos administrando o produto a testar directamente no meio que contem o material biológico, ou incorporando-o no alimento, na prática habitual realizam-se por exposição de conjuntos iguais de organismos a várias condições, nomeadamente diferentes concentrações do produto na água.

Embora a morte seja a resposta limite a efeitos adversos provocados por um determinado tóxico, é a mais facilmente detectável, pelo que geralmente os testes de toxicidade aguda são efectivamente testes de letalidade aguda. Normalmente a morte é reconhecida pela perda de movimento (especialmente o movimento das brânquias, nos peixes) ou pela perda de reacção a estímulos exteriores (por ex. uma picada).

Experimentalmente, a resposta de 50% é a medida mais reprodutível de toxicidade de uma substância, e 96h (ou menos) é o tempo de exposição padrão, visto que normalmente, é um período de tempo suficiente para que se verifique a acção letal aguda. Consequentemente, a medida de toxicidade aguda mais utilizada é a concentração média letal em 48 ou 96h, sendo definida como a concentração letal para 50% de indivíduos de uma população sujeita à exposição de um tóxico, em determinadas condições experimentais (Sprague, 1969). Contudo, como a morte não é facilmente determinada para alguns invertebrados, uma concentração média efectiva (CE 50) pode ser estimada, em substituição da CL 50-48h. Nestes casos, como por exemplo com as dáfnias, considera-se a imobilização como critério para estimar a CE 50.

Com outros invertebrados (por ex., camarões), são utilizados a imobilização e a perda de equilíbrio, definida como a incapacidade para manter a postura normal, para estimar a CE 50. Nos peixes a perda de equilíbrio verifica-se habitualmente antes da morte.

Seguidamente listam-se algumas situações que ilustram a utilidade dos testes estáticos de toxicidade aguda (Macek e col., 1978):

- obtenção de estimativas do limite superior de concentrações de produtos que produzem efeitos tóxicos;
- avaliação da toxicidade relativa de um grande número de substâncias;
- avaliação da sensibilidade relativa de organismos aquáticos;
- avaliação de efeitos da qualidade da água (por ex., concentração de oxigénio dissolvido, pH, salinidade, dureza, partículas em suspensão), na toxicidade de produtos;
- desenvolvimento de uma relação "concentração-resposta" e do significado da duração de exposição a determinado produto.

3.2.1 Tóxicos de referência

Consideram-se tóxicos de referência, os produtos químicos utilizados como "padrões" de toxicidade e que visam permitir comparar níveis de toxicidade e, também, níveis de sensibilidade de diferentes espécies.

Alderdice (1963) propõe que os tóxicos de referência observem os seguintes critérios:

- elevada solubilidade em água;
- dissolução completa para valores de $\text{pH} \geq 7$;
- estabilidade para valores de $7 \leq \text{pH} \leq 8.5$;
- disponibilidade no estado sólido seco com elevada pureza;
- facilidade de determinação quantitativa;
- apresentação de toxicidade para peixes, a baixas concentrações.

Para Adelman e col., (1976) os critérios indicados devem ainda verificar as seguintes qualidades:

- permitir a detecção de peixes com malformações e, ou doenças;
- aplicação em ensaios estáticos ou contínuos;
- manipulação fácil;
- proporcionar resposta homogênea dos peixes.

Tentando satisfazer os diferentes critérios, Davis e col., (1975) propuseram o pentaclorofenol de sódio como tóxico de referência, bem como Adelman e col., (1976) que indicam também o cloreto de sódio. A AFNOR (1978) recomenda a utilização do dicromato de potássio, o que foi seguido na execução do presente trabalho.

3.3 Toxicidade crónica (Subletal). Bioacumulação

Os ensaios de avaliação da toxicidade aguda constituem uma primeira aproximação da ecotoxicidade, dando informação sobre a importância do risco da exposição de organismos a uma determinada substância (ou a um efluente) (Giesy e Graney, 1989). A simplicidade do princípio e a rapidez da sua execução permitiram adoptá-los como meio para determinação da toxicidade, na regulamentação que diz respeito a novas substâncias químicas e efluentes industriais.

Entretanto, o valor preditivo dos ensaios de toxicidade aguda é contestado (Malins, 1989), considerando-se que a letalidade é um critério extremo para se conhecer a nocividade de uma substância e

que aqueles ensaios não fornecem informação sobre os mecanismos que determinaram a toxicidade.

Para Brown (1981) e Maltby e Calow (1989), os resultados obtidos com ensaios de toxicidade aguda não são generalizáveis, devendo ao contrário, ser criteriosamente interpretados. Consequentemente, é importante estudar a toxicidade subletal para se poderem compreender os efeitos tóxicos, para além dos letais, visto que são aqueles que se verificam na maior parte das situações reais de poluição do meio ambiente. Os efeitos não letais podem ser de natureza diversa, nomeadamente, fisiológica, bioquímica, histopatológica, comportamental e, sobretudo, alterações do crescimento e da reprodução.

Normalmente, a fauna de águas poluídas está exposta, por longos períodos, a concentrações relativamente baixa de tóxicos, e não a níveis de poluição que provoquem uma mortalidade rápida. Assim, é importante o estudo dos efeitos da exposição a níveis subletais de poluição sobre organismos aquáticos, por períodos que representem pelo menos uma proporção substancial do seu ciclo de vida.

A preferência pelos estudos de toxicidade letal aguda tem sido frequentemente criticada, atribuindo-se-lhe limitada relevância para a avaliação de situações reais. No entanto, os toxicologistas mantêm a sua utilização, apesar das limitações referidas, devido às dificuldades, conceptuais e técnicas, envolvidas na medição da toxicidade subletal. Relativamente poucas espécies podem ser mantidas satisfatoriamente, em laboratório, por longos períodos e, dificilmente, ali completam o seu ciclo de vida, pois os seus requisitos ambientais são muito complexos e por vezes até desconhecidos.

Necessariamente, para estudar a toxicidade subletal utilizam-se espécies que possam ser mantidas em laboratório, preferindo as que têm sensibilidade média, isto é, nem extremamente sensíveis nem muito resistentes. No entanto, recentemente têm sido desenvolvidas técnicas para estudos "on line" que, para além de usarem espécies indígenas, permitem aproximar melhor as condições reais do meio.

A avaliação da resposta é outro problema que se coloca aos testes subletais, visto que, enquanto a morte de um organismo é uma resposta inequívoca e facilmente identificável à acção tóxica, os critérios de avaliação de efeitos tóxicos subletais têm uma definição complicada e o seu significado biológico é frequentemente difícil de avaliar. Por outro lado, a aplicação de dados obtidos com estudos de toxicidade letal a problemas práticos de poluição é difícil, senão impossível, na ausência de alguma informação sobre toxicidade subletal. Assim, uma grande variedade de métodos para medição da toxicidade subletal tem sido utilizada, referindo-se, seguidamente, os mais importantes.

3.3.1 Testes de toxicidade monoespecíficos

Devido à dificuldade prática de manter organismos, por períodos muito longos, sob condições experimentais, os estudos de toxicidade subletal geralmente socorrem-se do uso de critérios histológicos, patológicos, bioquímicos, hematológicos, fisiológicos ou de comportamento do efeito tóxico, em experiências com a duração apenas de semanas (Sprague, 1971). O objectivo destas experiências é, essencialmente, determinar o estado de saúde de organismos expostos a níveis subletais de poluentes, o que vem sendo facilitado pela utilização de técnicas sofisticadas de análise e de diagnóstico. No entanto, este pressuposto é aparente visto que a avaliação de valores obtidos para as "variáveis" implica o conhecimento prévio da sua gama normal de valores, da forma como é afectada pelo estado fisiológico e da história ambiental do animal.

Para muitos organismos aquáticos, incluindo peixes, o conhecimento detalhado da sua bioquímica e fisiologia é, por vezes, ainda incompleto. Assim, embora seja possível constatar que um resultado particular, é estatisticamente diferente do que se obteve para os organismos "testemunha", não se pode directamente inferir que a diferença tenha alguma consequência ecológica. O valor "anormal" detectado pode não significar quaisquer danos provocados ao peixe, mas apenas um ajuste metabólico ao alcance da capacidade do animal para compensar condições ambientais em mudança, que são características normais da vida aquática e para a qual muitos organismos têm grande tolerância.

Na Figura 3.2 reproduz-se o diagrama desenvolvido por Lloyd (1972), que mostra a hipotética relação entre o enfraquecimento fisiológico, após exposição a poluentes, e a consequente incapacidade do peixe.

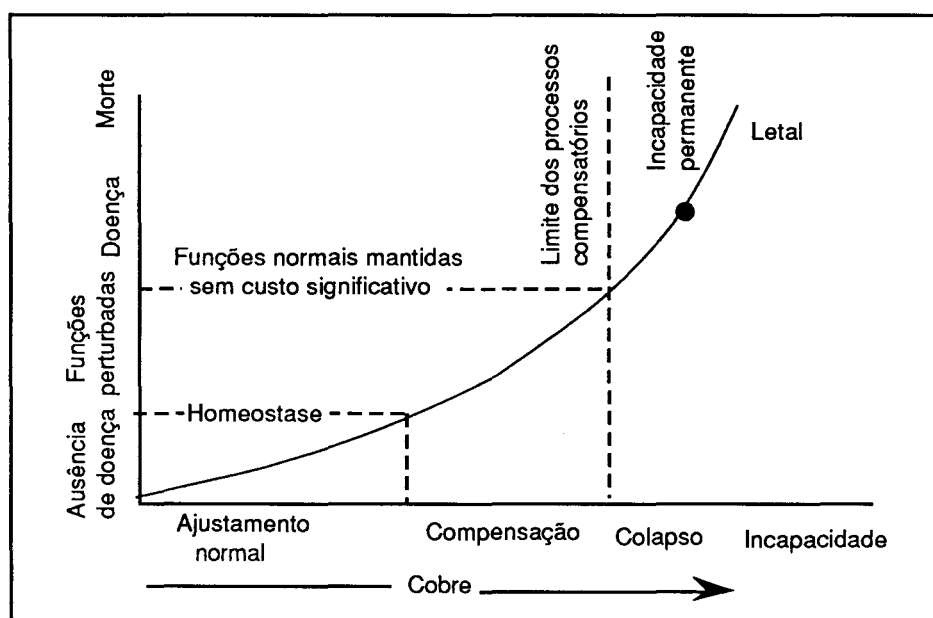


Figura 3.2 - Relação entre o enfraquecimento fisiológico de peixes após exposição a concentrações crescentes de poluentes e as disfunções provocadas (Adaptado de Lloyd,1972)

Valores obtidos para variáveis fisiológicas ou bioquímicas, alterações de comportamento do organismo ou da histologia de tecido, correspondem a áreas do gráfico indicadas por "homeostase" ou "funcionamento normal mantido sem custo significativo", embora estatisticamente possam ser diferentes dos valores determinados para os indivíduos "testemunha". Ao toxicologista coloca-se o problema de distinguir quando é que o valor de uma variável medida, é suficientemente diferente do que lhe corresponde para o indivíduo "testemunha", caindo fora dessas duas zonas.

É geralmente aceite que o efeito de um poluente sobre o crescimento, reprodução ou desenvolvimento de uma espécie é um critério inequívoco de efeitos tóxicos subletais, já que o seu significado ecológico é razoavelmente claro.

Como anteriormente foi já referido muitos vertebrados, incluindo os peixes, produzem nos tecidos um grupo de proteínas de baixo peso molecular, as metalotioninas, quando expostos a concentrações subletais de metais pesados (Kagi e Nordberg, 1979). A formação dessas proteínas constitui portanto um indicador de exposição a níveis anormalmente elevados de metais pesados e a medição dos níveis das referidas proteínas nos tecidos tem sido utilizada para avaliar impactes da poluição provocada por metais em populações de peixes (Roch e col., 1982).

3.3.2 Ecossistemas experimentais

Um método alternativo para o estudo da toxicidade subletal consiste na utilização de ecossistemas experimentais. Neste método, prefere-se a utilização simultânea de duas ou mais espécies, geralmente representando diferentes níveis tróficos, constituindo uma tentativa de aumentar a representatividade do estudo. A ecologia de uma espécie, por exemplo, não depende apenas da sua relação com o ambiente químico e físico e dos processos endógenos à população, mas também do seu relacionamento com outras espécies (presa, predadores, competidores, parasitas) que pertencem ao seu habitat. Assim o efeito ecológico de um poluente sobre uma espécie não se limita às suas próprias características, podendo a sua acção ser incrementada ou atenuada, consoante a natureza das relações intra-específicas que existam.

Os ecossistemas experimentais são úteis para estudar fenómenos como a distribuição de poluentes entre a água, sedimentos e tecidos vivos, a respectiva biodegradação e também a sua acumulação nos organismos vivos, ou a sua passagem pela cadeia alimentar.

A complexidade dos ecossistemas experimentais é variável desde sistemas de pequena escala, em que as condições experimentais são bem controladas, mas que constituem simplificações grosseiras dos sistemas reais, até sistemas de grande escala que, embora reproduzam melhor os sistemas naturais, não podem ser controlados com tanta precisão como os primeiros e têm menor reprodutividade experimental (Giddings, 1983). Por exemplo, para o estudo do efeito de

temperaturas elevadas da água em comunidades de invertebrados e dos efeitos de efluentes domésticos em populações de gastrópodes têm sido utilizados modelos físicos de canais e de rios à escala laboratorial e de campo (Arthur e col., 1982; Watton e Hawkes, 1984). Os sistemas de grande escala são normalmente muito dispendiosos e a sua utilização é limitada a casos em que é necessário complementar e interpretar resultados de métodos mais económicos. Dada a grande variação de escala, complexidade e objectivos dos ecossistemas experimentais é difícil sistematizar os diferentes tipos que têm sido usados. No entanto pode considerar-se que, de um modo geral, constituem instrumentos de grande utilidade para validação de resultados obtidos em laboratório a custos inferiores ao dos estudos de campo.

3.3.3 Bioacumulação

A bioacumulação ocorre quando a razão de retenção de um elemento ou produto químico por um organismo, excede a respectiva razão de eliminação (Khan e col., 1989).

A bioacumulação é uma das mais importantes consequências possíveis da toxicidade subletal visto que, ao longo do tempo, os poluentes podem acumular-se nos tecidos dos organismos até atingirem níveis prejudiciais. Como muitas espécies aquáticas são utilizadas para consumo humano, é evidente a importância desta acumulação para a saúde pública.

Diversas entidades, nacionais e internacionais, fixam limites de concentração de poluentes (em particular de metais pesados) nos tecidos de organismos para consumo humano. O estudo da retenção, metabolismo, excreção e distribuição de poluentes pelos organismos e concretamente pelos seus tecidos, pode fornecer um contributo muito significativo para a compreensão dos mecanismos envolvidos. Os níveis de poluentes nos tecidos de organismos aquáticos são amplamente utilizados como indicadores do grau de contaminação dos meios correspondentes, principalmente quando a presença de poluentes é intermitente ou quando as suas concentrações são muito reduzidas e dificultam a respectiva análise química. Por outro lado, muitos tóxicos,

metais pesados e compostos orgânicos, como alguns pesticidas, passam dos tecidos do animal presa para o predador, podendo concentrar-se neste, isto é, atingir níveis bastante superiores, o que pode constituir uma ameaça para os organismos dos níveis tróficos superiores.

Há diversos modelos de bioacumulação, cuja complexidade varia de acordo com o número de compartimentos e variáveis que consideram. Os modelos têm por objectivo, fundamentalmente, constituir um instrumento que permita prever a bioacumulação de tóxicos através de medições experimentais simples, substituindo a realização de experiências, morosas e dispendiosas. No modelo mais simples são considerados dois compartimentos: o organismo e o ambiente. O poluente entrará no organismo a uma taxa dependente da quantidade em que se encontra presente no ambiente e será eliminado do organismo a uma taxa dependente da quantidade presente no organismo. Este modelo pode ser expresso matematicamente e prediz que a contaminação dos organismos expostos a um nível constante de poluentes poderá atingir um equilíbrio, isto é, que a concentração de poluente aumentará até um certo nível, mantendo-se constante posteriormente. De acordo com este modelo, a descontaminação de organismos (em água não contaminada), isto é, a variação da concentração de poluente no tempo, segue uma exponencial negativa.

A utilidade prática do modelo é limitada, uma vez que a maior parte dos organismos não pode ser considerado como um único compartimento. Estudos da distribuição de poluentes em animais mostram que o poluente está desigualmente distribuído pelos vários tecidos do corpo (Ray, 1978; Bukley e col., 1984; Villegas-Navarro e Villarreal-Treviño, 1989). Esta a razão porque a concentração global de poluente no organismo, não é um indicador significativo de efeito. Assim, tendo em conta que um organismo começará a sofrer danos quando a concentração do tóxico atingir um nível crítico num determinado órgão, foram concebidos modelos que consideram um organismo como um conjunto de compartimentos interactuantes. Estes modelos consideram os diferentes órgãos (fígado, rim, cérebro, etc) como compartimentos interactuantes, entre eles e o ambiente externo, ligados pelo sangue (ele próprio considerado um compartimento).

Noutros modelos o intercâmbio de poluentes entre os compartimentos é assumido como o somatório de processos distintos. Por exemplo: a retenção de um poluente do ambiente pode ocorrer através da superfície do corpo, ou por ingestão de partículas alimentares; a sua eliminação pode efectuar-se por difusão, por excreção renal ou gastrointestinal, ou ainda por degradação metabólica (Moriarty, 1984).

Apesar da dificuldade, ou mesmo impossibilidade de se obterem modelos generalizados, a utilidade dos estudos da bioacumulação e dos seus mecanismos é inquestionável, face à necessidade de se compreenderem as implicações dos processos bioacumulativos de poluentes nas diferentes espécies para as cadeias alimentares (Moriarty, 1984).

Quando uma substância química, ou alguns dos seus produtos de transformação, resiste total ou parcialmente aos processos de degradação (física, química e biológica), pode considerar-se persistente, isto é, potencialmente acumulável nos biótopos, ou nos organismos vivos. Todo o organismo vivo pode, na presença de uma substância determinada e em função das suas capacidades metabólicas em relação à substância, da sua concentração, da toxicidade da substância, da dose que absorve e da continuidade das agressões, reagir de formas diferentes, como a seguir se sintetiza:

- absorver a substância e morrer, se as doses absorvidas forem superiores ao correspondente limite de toxicidade;
- absorver a substância e ter capacidade para a metabolizar e eliminar, sem perigo dos metabolitos resultantes, estes eventualmente tóxicos, para outras espécies;
- absorver a substância e eliminá-la sem a transformar, e sem ser afectado;
- concentrar a substância ou os seus metabolitos, geralmente com as suas substâncias de reserva nas gorduras, podendo os efeitos tóxicos vir a manifestarem-se, eventualmente, a longo prazo, logo que as concentrações acumuladas ultrapassem os limites de toxicidade.

3.3.3.1 Processos de Acumulação

Nos peixes, as trocas de metais pesados com o meio, fazem-se principalmente, por dois processos: adsorção e absorção.

- Adsorção

É o fenómeno correspondente à fixação de metais sobre a superfície externa do organismo. Este tipo de fixação é regido por leis físico-químicas e, na maior parte dos casos, não provoca qualquer toxicidade para o organismo.

- Absorção

É a bioacumulação propriamente dita, correspondendo a uma acumulação biológica, definida como sendo a capacidade de um organismo acumular um elemento químico a partir do seu meio ambiente (Ramade, 1977).

A incorporação de metais pesados nos sistemas biológicos faz-se por intermédio de três vectores: água, partículas em suspensão e alimento.

- Bioacumulação directa

É a acumulação por intermédio da água, em contacto directo com o organismo. É uma via importante de fixação de metais pesados nos peixes e a única via nos produtores primários (Ramade, 1977). Esta via de acumulação é sobretudo intensificada nos órgãos das funções respiratória, digestiva, de armazenamento e de excreção.

- Bioacumulação indirecta

É a acumulação através de partículas em suspensão, de sedimento ou de alimento, ingeridas pelo organismo. Os organismos que pertencem aos níveis tróficos mais elevados da cadeia alimentar, são os mais expostos a este tipo de contaminação. Neste tipo de bioacumulação, a taxa de fixação dos metais, depende directamente da quantidade absorvida ou adsorvida nas partículas.

3.3.3.2 Vias de Absorção

Os modelos explicativos dos mecanismos de acumulação e de metabolização de metais pesados nos organismos aquáticos consideram três processos independentes, para o transporte através da membrana: difusão passiva, endocitose e transporte activo (George e Pirie, 1980; Simkiss e col., 1982; Boudou, 1982; Luoma, 1983).

- Difusão passiva

É uma difusão proporcional a um gradiente de concentração, num campo eléctrico ou sob a influência da pressão. Este processo exige um carácter lipófilo do elemento metálico transportado, porque os iões inorgânicos no estado livre são largamente lipófobos, para que o seu transporte, por um solvente ou por um outro soluto, se faça sob uma forma ligada (Boudou, 1982).

- Endocitose (Pino e Fagocitose)

Em relação ao transporte através da membrana, esta via é energeticamente mais económica no caso de grânulos insolúveis, dispensando o organismo de um dispêndio energético numa eventual excreção.

Nos peixes, a pinocitose tem um papel primordial na absorção das macromoléculas ao nível do segundo segmento do intestino (Boudou, 1982).

- Transporte activo

O transporte activo efectua-se por meio de transportadores através das membranas de natureza proteica. Este sistema é muito eficaz para baixas concentrações e para compensar o fluxo bidireccional por simples difusão (Simkiss e col., 1982).

A cinética dos ligandos que atravessam a membrana plásmica pode variar directamente com o potencial redox ou com o gradiente de pH na célula. Na Figura 3.3 reproduz-se esquematicamente o processo de assimilação, acumulação e eliminação do cobre, à semelhança do

proposto por Williams (1981) para metais e que seguidamente se descreve. Os metais no meio ambiente aquático, podem ser fixados por um ligando (L1). A célula sintetiza um ligando (L2) que transporta os iões metálicos através da membrana plásmica. No citoplasma, um outro ligando (L3) fixa os metais. Estes dois últimos ligandos (L2 e L3) permitem à célula acumular selectivamente os iões inorgânicos, por um processo regulado pela síntese ou pela degradação de ligandos apropriados. As concentrações do metal no interior da célula podem ser controladas por remoção da solução, através de biomoléculas especiais, isto é, L4 (metalotioninas, lisossomas).

A absorção de cobre parece ser um processo passivo. No entanto, têm sido feitas algumas tentativas para relacionar a acumulação à estabilidade de complexos formados, entre o cobre e ligandos orgânicos.

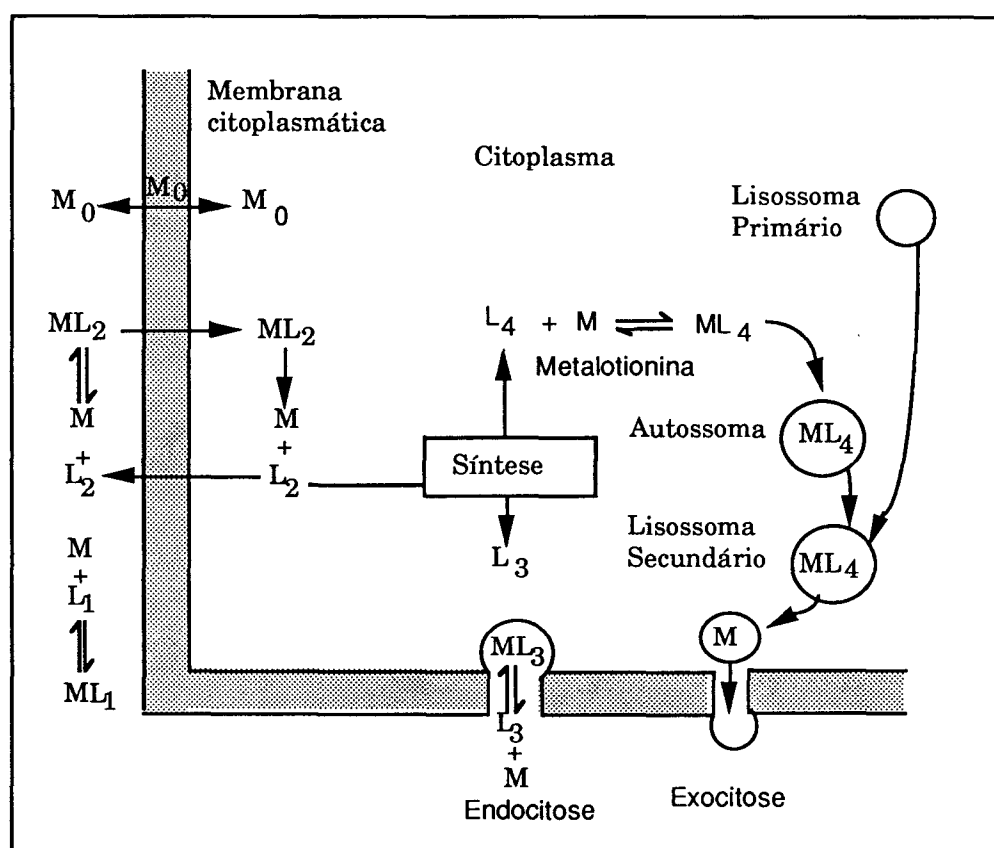
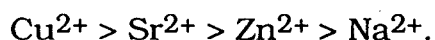


Figura 3.3 - Processos de assimilação, acumulação e eliminação de cobre
(Modificado de Williams, 1981 e de George e Viarengo, 1985)

No caso do transporte do ferro, nos mamíferos, existe um transportador orgânico específico: a transferrina, libertada pela célula, e um local receptor ao nível membranar, pelo qual o ferro tem acesso ao citoplasma, sendo depois armazenado nas moléculas de ferritina. O ferro é fixado sob a forma de óxido ferroso, e libertado no citoplasma como óxido férrico (Simkiss e col.,1982).

O número de colisões entre os metais e a superfície celular externa é um factor determinante no transporte activo e na endocitose. Fortes concentrações de espécies metálicas na água favorecem esta colisão. Crist e col., (1981) demonstraram que os metais deslocam os protões adsorvendo-se sobre a parede celular. Esta troca iónica permite classificar os iões segundo o seu poder de absorção, por ordem decrescente:



As substâncias químicas bioacumuláveis apresentam, regra geral, duas características principais:

- importante estabilidade química, tanto no meio como nos organismos vivos;
- forte lipossolubilidade, o que permite uma passagem fácil do meio para o interior dos organismos aquáticos por via branquial ou digestiva, sendo regulada, essencialmente, por fenómenos de difusão passiva através das membranas lipoproteicas. A lipossolubilidade permite por outro lado o armazenamento biológico da substância, principalmente nos órgãos ricos em lípidos (fígado, gorduras).

Apesar dos peixes não serem os organismos mais directamente implicados em fenómenos de bioacumulação aquática, são os que mais frequentemente se utilizam para o seu estudo, principalmente porque fazem parte da dieta alimentar do homem e a sua fisiologia é bem conhecida, constituindo espécies facilmente manipuláveis em laboratório.

São utilizados peixes adultos, pertencentes a diferentes espécies, em princípio pouco frágeis, de forma a permitir realizar ensaios de longa duração, evitando mortalidades acentuadas. De um modo geral, utilizam-se peixes de tamanho suficiente para se poderem isolar os diferentes órgãos e pôr em evidência a bioacumulação localizada. Seguidamente citam-se algumas das espécies mais utilizadas, em estudos de bioacumulação:

- *Cyprinus carpio* L., (carpa);
- *Salmo gairdneri*, (truta arco-íris);
- *Brachydanio rerio*, (peixe zebra);
- *Lepomis macrochirus*, (perca-sol).

3.3.3.3 Factores de Concentração e de Poluição

O Factor de Concentração (FC) é definido como sendo a razão entre a concentração de metal no organismo e a respectiva concentração no meio. Assim, se a concentração do metal no meio é conhecida, a concentração nos organismos pode ser calculada a partir dos seus factores de concentração. Os factores de concentração têm sido usados em modelos para predizer a concentração de metais quando as descargas são contínuas e se atingem condições de estado estacionário (Harrisson, 1986).

A retenção e a eliminação de elementos, persistem ao longo da vida de um organismo e podem variar consideravelmente com flutuações nas necessidades metabólicas. Quando a taxa de retenção excede a taxa de eliminação, cria-se um diferença de concentração entre o organismo e o seu ambiente, a qual pode ser mantida por um processo de ligação aos constituintes subcelulares e metabolitos celulares, ou por processos que requerem o consumo de energia metabólica. Assim, a concentração pode ser alterada por factores que afectam a actividade metabólica.

A acumulação de um elemento específico pode surgir por necessidade de crescimento, reprodução, e formação óssea, ou porque o mecanismo de eliminação é menos eficiente que o de retenção.

Outro parâmetro útil é o factor de poluição (FP), o qual permite comparar as concentrações de metais em indivíduos contaminados com as de indivíduos em situação de poluição nula. Este parâmetro é igualmente utilizado para mostrar a importância do impacto de uma fonte de contaminação, comparando estações a montante e a jusante da referida fonte.

4. PLANO EXPERIMENTAL

De acordo com os objectivos do presente trabalho, foi fixado um plano experimental constituído por três fases, que se resumem na Tabela 4.1 e que seguidamente se descrevem.

Fase experimental I

Nesta fase foi determinada a CL 50-48h do cobre para *Cyprinus carpio* L. para permitir estudar as limitações decorrentes da definição das concentrações máximas aceitáveis de tóxico como fracções da CL 50-48h.

Experiências - Quatro séries, uma por cada estação do ano, para durezas de água de 50, 100 e 300 mg.l⁻¹ em CaCO₃.

Fase experimental II

Nesta fase experimental efectuaram-se ensaios de bioacumulação do cobre em *Cyprinus carpio* L. em função da dureza da água, utilizando-se uma fracção da respectiva CL 50-48h, determinada na fase experimental anterior, com o objectivo de identificar a correspondente cinética de acumulação.

Experiências - Três, correspondentes às durezas de água, estudadas na Fase Experimental I.

Fase Experimental III

Nesta fase foram realizados ensaios de bioacumulação do cobre em *Cyprinus carpio* L., utilizando diferentes fracções da CL 50-48h (0.1, 0.2, 0.3 e 0.4), previamente determinadas para a dureza de água de 100 mg.l⁻¹ em CaCO₃, com o objectivo de obter informação sobre a capacidade de sobrevivência do organismo a doses subletais de tóxico.

Adicionalmente, foi testada a capacidade de adaptação do organismo a concentrações crescentes do tóxico.

Experiências - Cinco, com a duração de quatro semanas, sendo quatro realizadas a concentrações de tóxico constante e a quinta a concentrações de tóxico crescentes, com intervalo semanal.

Tabela 4.1 - Plano experimental das experiências realizadas

FASE EXPERIMENTAL I					
DETERMINAÇÃO DA CL 50-48h EM FUNÇÃO DA DUREZA					
Experiência	Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)				
1.1	50				
1.2	100				
1.3	300				
FASE EXPERIMENTAL II					
BIOACUMULAÇÃO EM FUNÇÃO DA DUREZA					
Experiência	Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	Concentração de cobre (µg.l ⁻¹)			
2.1	50	23			
2.2	100	55			
2.3	300	150			
FASE EXPERIMENTAL III					
BIOACUMULAÇÃO					
A DIFERENTES FRACÇÕES DA CL 50-48h			A DOSES CRESCENTES DA CL 50-48h		
Exp.	Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	[Cu] (µg.l ⁻¹)	Exp.	Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	[Cu] (µg.l ⁻¹)
3.1	100	28	3.5	100	1ª sem. - 28
3.2	100	56			2ª sem. - 56
3.3	100	84			3ª sem. - 84
3.4	100	112			4ª sem. - 112

Com o objectivo de estudar a acumulação e localização de cobre a nível dos diferentes órgãos, verificando o aparecimento de eventuais mudanças estruturais, foram realizados exames histológicos e histoquímicos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO: A CARPA

5.1.1 Introdução

As espécies da família dos ciprinídeos colonizaram uma grande variedade de biótopos, sómente em águas doces, podendo encontrar-se em diversos habitats (ribeiros, rios, lagos e tanques) e com uma grande distribuição geográfica, sobretudo devido à intervenção do homem.

Podem encontrar-se na maior parte dos continentes, com excepção da América Central e da América do Sul, suportando uma ampla gama de temperaturas, de próximo de 0°C a mais de 30°C, embora o seu crescimento seja muito reduzido abaixo de 15°C. Por outro lado, os ciprinídeos podem alimentar-se a todos os níveis da cadeia trófica: fitoplâncton, macro e micro-zooplâncton, bentos, macrófitas e mesmo peixes.

As características referidas conferem aos ciprinídeos numerosas vantagens para a sua cultura, estando na origem da sua ampla distribuição, bem como da sua produção (a produção total anual é próxima dos 2 milhões de toneladas) e produtividade.

Assim, no presente estudo, adoptou-se a carpa (*Cyprinus carpio* L.) por se tratar de uma das espécies mais representativas dos ciprinídeos.

5.1.2 Caracterização sistemática

As espécies do género *Cyprinus* foram identificadas por Linnaeus em 1758 (Rojo, 1988).

A posição sistemática da carpa é a seguinte:

Phylum	Chordata
Subphylum	Gnathostomata

Superclasse	Ichthyopterygii
Classe	Osteichthyes
Subclasse	Actinopterygii
Infraclasse	Teleostei
Superordem	Ostariophysi
Ordem	Cypriniformes
Subordem	Cyprinoidei
Família	Cyprinidae
Género	<i>Cyprinus</i>
Espécie	<i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)

5.1.3 Origem e área de expansão

A carpa é originária da Pérsia e das regiões temperadas da Ásia, tendo sido introduzida na Europa Central e Ocidental na Idade Média (Scharperclaus, 1962).

No século XIV e XV verificou-se a sua dispersão um pouco por todo o lado, por intermédio dos monges, tornando-se a principal espécie de cultura no Continente Europeu e particularmente na Europa Central. Admite-se que o aparecimento da carpa na Península Ibérica e, consequentemente, em Portugal, se deva aos Romanos, que a introduziram quando da ocupação territorial da Península, no séc. IV.

A carpa é o principal ciprinídeo de cultivo na Europa (Huet, 1978). Nos rios portugueses é frequente encontrar a carpa comum, com especial incidência para os rios Douro e Tejo e seus efluentes (Sacadura, 1980).

Em Portugal, para além da carpa comum, conhecem-se ainda as seguintes variedades:

- Carpa dourada (*Cyprinus auratus*) - de coloração amarelo-avermelhada.
- Carpa couro (*Cyprinus cariaceus* LAC) - cuja pele é muito dura e com poucas escamas, encontrando-se estas geralmente junto ao perfil dorsal, antes da barbatana caudal e por cima das barbatanas peitorais e ventrais.

- Carpa espelho (*Cyprinus specularis* LAC) - com escamas de tamanho maior que o normal e dispostas em duas bandas longitudinais separadas por zonas completamente desprovidas de escamas.

5.1.4 Morfologia, anatomia e fisiologia geral

5.1.4.1 Morfologia

A carpa apresenta uma cabeça forte e achatada dos lados, com olhos pequenos. Boca pequena com lábios grossos e com dois pares desiguais de barbilhos. Tem cinco dentes faríngeos dispostos em três filas.

O corpo é ovóide, um pouco comprimido lateralmente. Apresenta escamas de aspecto metálico situadas nas regiões ventral e dorsal bem como sobre os flancos, na região próxima da base das barbatanas, distribuídas sem ordem.

Na carpa espelho, as escamas são grandes, com irregularidades causadas por metabolismo anormal de substâncias minerais de origem hereditária (Muus e Dahlström, 1973).

A carpa comum apresenta uma barbatana dorsal de base larga, com três a quatro raios simples, o último dos quais é ósseo com o bordo posterior denticulado, seguido de 16 a 22 raios. A barbatana anal, de base curta, é suportada por dois a três raios simples, sendo o último também espessado e denticulado no bordo posterior. A barbatana caudal é grande e apresenta os lóbulos arredondados. As barbatanas ventrais e peitorais são também grandes.

A coloração da carpa varia segundo o meio em que vive, sendo geralmente verde acastanhada no dorso e branco-amarelada no ventre (Huet, 1978).

5.1.4.2 Anatomia

A anatomia interna geral da carpa, *Cyprinus carpio* L. está esquematizada na Figura 5.1.

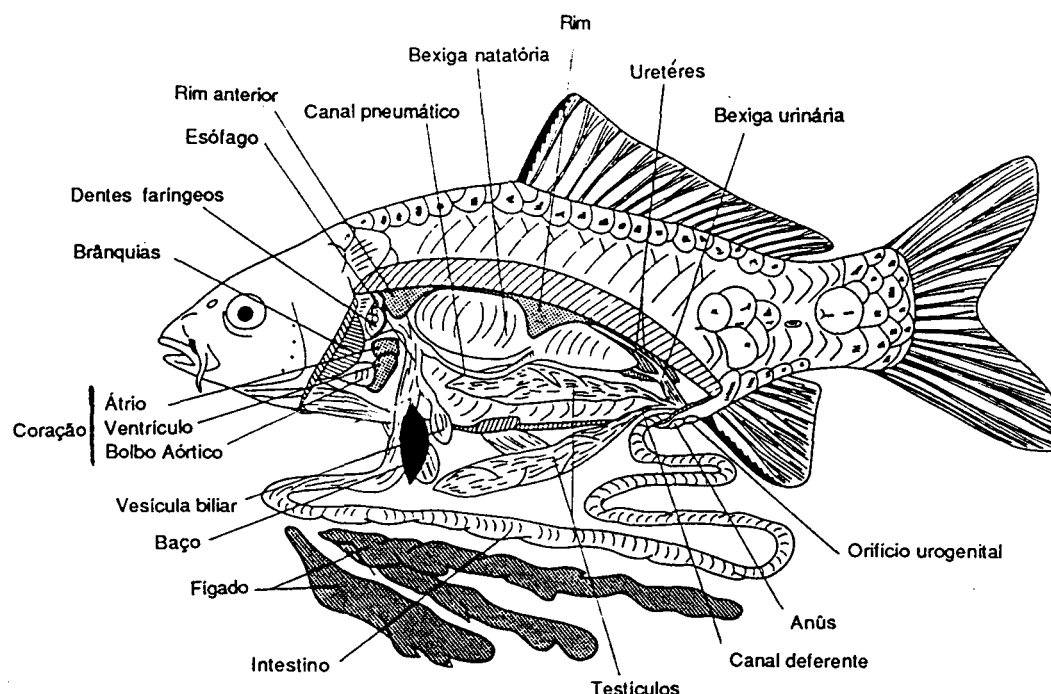


Figura 5.1 - Anatomia interna da carpa (*Cyprinus carpio* L.)
(Adaptado de De Kinkelin e col., 1985)

- Sistema digestivo

A carpa possui mand6bulas sem dentes, observando-se no entanto, mais atr6s, os dentes far6ngeos. A faringe, que possui br6nquias de ambos os lados, continua-se pelo es6fago ao qual se segue o est6mago. Anteriormente, na cavidade do corpo, observa-se um f6gado grande, uma ves6cula biliar e o canal biliar que faz a liga66o ao intestino. O p6ncreas encontra-se indiferenciado.

- Sistema circulat6rio

O cora66o tem duas c6maras e est6 situado por baixo da faringe, na cavidade peric6rdica. O ba6o, que faz parte do sistema sangu6neo, 6 o 6nico 6rg6o que se pode comparar a um g6nglio linf6tico. De cor vermelha, possui, geralmente, os bordos bem definidos no estado normal, situando-se perto do est6mago, e sendo normalmente fragmentado em dois.

- Sistema respiratório

Respira por brânquias, que são em número de quatro, situadas numa câmara branquial comum de cada lado da faringe e cobertas pelo opérculo. Cada brânquia consiste numa dupla fiada de filamentos branquiais; cada filamento possui numerosas placas transversais, pequenas, cobertas por um fino epitélio. Cada brânquia está sustentada por um arco branquial cartilaginoso e, no seu bordo interno, possui as branquiespinhas, cuja função é evitar a entrada de partículas duras e impedir a passagem de alimento para as aberturas branquiais.

Outro órgão que também faz parte do sistema respiratório é a bexiga natatória, que é um órgão de equilíbrio. Nos ciprinídeos, liga-se ao esôfago por um estreito canal pneumático e está dividida em duas partes (Muus e Dahlström, 1973).

- Sistema excretor

Os dois rins comprimidos e de cor escura, estão situados dorsalmente entre a bexiga natatória e as vertebrae. As substâncias a eliminar pelo sangue, são transportadas, através dos ureteres, para a bexiga.

- Sistema reprodutor

Os sexos são separados, actuando cada indivíduo, na altura da fecundação, na qualidade de macho ou de fêmea. As glândulas sexuais masculinas, testículos e as femininas, ovários, são internas e normalmente longitudinais, surgindo como estruturas pares.

5.1.4.3 Fisiologia geral

- Reprodução

No nosso país as carpas atingem a maturidade sexual ao fim de dois verões (Sacadura, 1980), enquanto que nos outros países da zona temperada, as fêmeas só atingem a maturidade entre os três e cinco anos e os machos entre os dois e os quatro anos (Huet, 1978). Nos trópicos este estágio é atingido ao fim de um ano e por vezes ao fim de seis meses (Bardach, 1972). Uma das causas desta diversidade de

valores, é a variação climática existente nas regiões em que estas determinações foram efectuadas, dado que é significativa a correlação entre a temperatura da água e a maturação dos órgãos sexuais dos peixes (Scharperclaus, 1962; Huet, 1978).

Os machos são mais pequenos que as fêmeas e apresentam na época de postura as verrugas nupciais, que se situam especialmente na nuca e nos opérculos, desaparecendo depois da reprodução.

Por volta dos três anos, atingem, geralmente, a maturidade sexual e é entre os meses de Abril e Junho que fazem uma pequena emigração para os locais de postura. A temperatura da água exigida para a postura é superior a 18°C, considerando-se que o valor ideal é de 20°C. Os locais preferidos encontram-se junto das ribeiras onde as águas são tranquilas, com pouca profundidade e abundante vegetação. A fêmea põe de cem mil a cento e cinquenta mil ovos por quilo de peso; geralmente uns trezentos mil. Estes ovos estão impregnados de um muco viscoso que os prende à vegetação existente no local. Após o lançamento do esperma, a actividade dos espermatozóides dura aproximadamente cinco minutos. Da eclosão dos ovos que pode variar de 3 a 7 dias a 2 semanas, dependendo da temperatura da água, nascem larvas com 5 a 8 mm de comprimento, transparentes e sem boca (Benguria e Camiña, 1975; Huet, 1978).

- Nutrição

O alimento ingerido é convertido em energia, sendo o excesso utilizado para o crescimento. A velocidade do crescimento depende, fundamentalmente, do conteúdo calórico do alimento e da respectiva quantidade. É comum que durante o crescimento um peixe de água doce, como a carpa, ingira por dia uma quantidade de alimento igual a metade do seu próprio peso. Um peixe jovem pode ingerir dois a três gramas de alimento por cada grama de peso que aumenta, o que se exprime por um coeficiente de nutrição de 2-3. O coeficiente de nutrição (CN) indica portanto o número de gramas de alimento necessário para aumentar de um grama o peso do corpo (Muus e Dahlström, 1973).

O CN aumenta com a idade, significando que, gradualmente, uma porção menos importante de alimento é utilizada para o crescimento, enquanto vai crescendo a parte utilizada para manter o metabolismo.

A carpa é um animal omnívoro. Na cadeia alimentar a carpa é um consumidor de 2ª ordem. Alimenta-se de plâncton enquanto jovem e posteriormente de larvas de insectos, oligoquetas, pequenos moluscos, ovos de outros peixes e mais raramente de vertebrados (peixes, batráquios). Alimenta-se também de algas, rebentos de plantas aquáticas, raízes, fibras e detritos vegetais. Quando criada artificialmente pode ser alimentada com compostos aglutinados em grânulos secos de várias dimensões, aos quais se dá o nome genérico de granulados (Sacadura, 1980).

A carpa (carpa espelho) é o ciprinídeo que apresenta crescimento mais rápido, pelo menos até aos sete anos, tendo às seis semanas um peso médio de cerca de 3.5 g (5-6 cm).

Na Figura 5.2 apresenta-se a relação média comprimento-peso da carpa (*Cyprinus carpio* L.), (Timmermans, 1989).

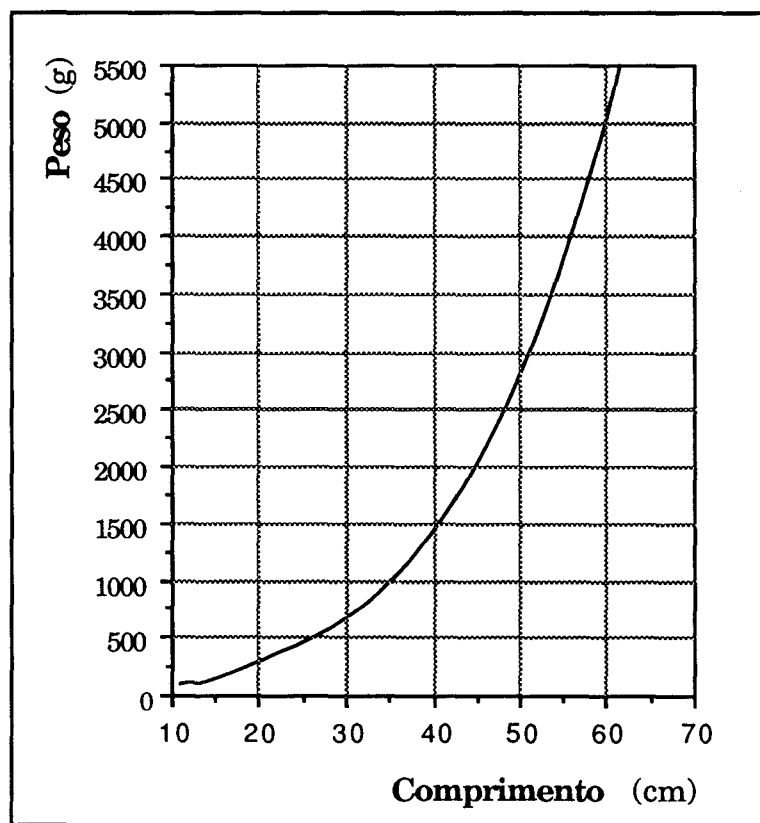


Figura 5.2 - Relação média comprimento/peso na carpa (*Cyprinus carpio* L.)

A actividade biológica da carpa compreende dois períodos que ocorrem de acordo com a temperatura da água. Durante a estação quente, os peixes estão activos, alimentam-se abundantemente e observa-se um crescimento efectivo. Pelo contrário, durante a estação fria, logo que a temperatura atinge valores abaixo dos 10°C, a actividade reduz-se, chegando mesmo a ser nula. Neste período podem mesmo sofrer uma diminuição de peso (entre 10-15% do seu peso total).

Considerando, que o crescimento é dependente da temperatura e portanto da estação quente (Verão), a idade das carpas (como em todos os teleósteos), refere-se, habitualmente, ao número de Verões. Assim, uma carpa nascida em Abril e não tendo completado um Verão designa-se por Classe₀; a partir do Outono designa-se por Classe₁ e assim sucessivamente (Schaeperclaus, 1962).

Na Figura 5.3 regista-se a evolução do peso das carpas, em cultura, durante os primeiros sete anos de vida na Europa Central.

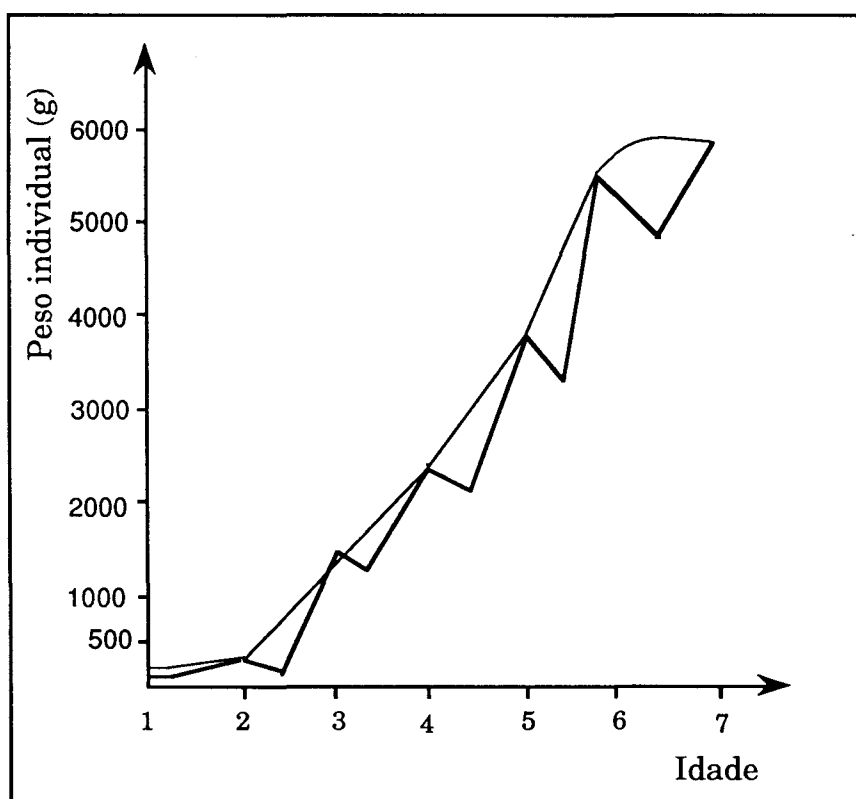


Figura 5.3 - Evolução do peso das carpas durante os primeiros sete anos de vida

A curva de crescimento das carpas é uma curva em "S", assimétrica, de concavidade voltada para cima até ao 6º ano e o inverso nos anos seguintes, não considerando as variações (negativas) que se verificam após cada Inverno.

Quanto à longevidade das carpas, Einselle (1956) citado por Schaeperclaus, (1962) verificou, em 60 observações, que 7 exemplares tinham 43 anos, mas que em nenhuma das observações se detectavam carpas que ultrapassassem os 45 anos, constatando também que aos 21 anos as carpas fêmeas estão ainda aptas para fins reprodutivos.

5.1.5 Ecologia

A carpa vive em águas calmas e temperadas, mesmo paradas ou fracamente correntes, procurando sempre locais profundos e com muita vegetação (Benguria e Camiña, 1975).

Dá-se facilmente nas águas do Centro e Sul do nosso País (Lencastre, s.d.; Sacadura, 1980). Pertence à biocenose dos fundos vasosos, nos quais encontra parte do seu alimento para além de protecção quando perseguida, podendo também, excepcionalmente, encontrar-se em ribeiras rápidas e frias. É extremamente rústica, podendo viver tanto em pequenos charcos, como nos grandes lagos e barragens.

No que diz respeito às condições de água requerida, a carpa possui ampla tolerância em relação à generalidade dos factores ambientais, como por exemplo:

- pH: compreendido entre 4.5 e 10.8, respectivamente como limites inferior e superior.
- Oxigénio dissolvido: 0.5 mg.l^{-1} é o mínimo tolerável; para valores compreendidos entre 0.5 e 3.5 mg.l^{-1} a carpa deixa de se alimentar e procura migrar para locais mais ricos em oxigénio.
- Temperatura: o desenvolvimento óptimo da carpa verifica-se a temperaturas compreendidas entre 20 e 28°C. Durante as fases de reprodução a temperatura exigida situa-se entre 18 e 20°C. Para

valores entre 5 e 13°C a actividade é muito reduzida, sendo praticamente nula para valores inferiores a 5°C (Huet, 1978).

O crescimento das carpas é normalmente rápido, apesar de se alimentarem apenas durante uma parte do ano, sendo, na fase final, mais rápido em cultura. Durante o Inverno, as carpas procuram lugares mais profundos e abrigados, escavando a terra do fundo com as barbatanas para fazer refúgios, aí se mantendo reunidas, por vezes amontoadas, num estado de semiletargia, passando esse tempo sem se alimentarem (Benguria e Camiña, 1975; Huet, 1978).

A carpa vive, geralmente, de doze a quinze anos, por vezes mesmo até aos vinte, podendo o seu período de vida ser diminuído devido a doenças, como por exemplo, o parasitismo.

5.1.6 Patologia e resposta à poluição

5.1.6.1 Modificações patológicas provocadas pelo meio ambiente

A acção nociva do meio ambiente exerce-se de forma directa e a maior parte das vezes, indirecta, provocando frequentemente reacções de "stress" nos peixes.

Apesar da carpa não ser dos peixes mais exigentes quanto à qualidade da água, há parâmetros, cuja variação provocam alterações no seu comportamento, como por exemplo: o pH, a temperatura e o oxigénio dissolvido.

- pH

O "stress" induzido pela acidez está associado ao aumento da secreção de muco (Ultsch and Gros, 1979; Daye and Garside, 1980).

A acidificação da água pode causar alguma anorexia, como observaram Waiwood and Beamish (1978) e pode reduzir a respiração pela acumulação de muco nas brânquias (Ultsch e Gros, 1979).

Korwin-Kossakowski e Jezierska (1985), observaram que as carpas reduzem o consumo de oxigénio, em meios com um valor de pH de 4.0, circunstância que também é referida noutros estudos (Jozuka e Adachi, 1979; e Ultsch e Gros, 1979). Assim, pode admitir-se que para valores ácidos de pH, a limitação das funções respiratórias, afecte o crescimento dos peixes.

- Temperatura

Para além dos choques térmicos, ou do seu efeito sobre a reprodução, é sobretudo indirectamente que a temperatura pode ter acção patogénica, condicionando o teor em oxigénio dissolvido, a absorção brânquial de tóxicos, o desenvolvimento de bactérias e parasitas, bem como o aparecimento de algumas reacções de defesa (de Kinkelin e col., 1982; Lamers, 1986).

- Oxigénio dissolvido

O teor em oxigénio dissolvido na água é também um parâmetro de grande importância para a saúde dos peixes. A longo termo influencia o crescimento, mas é principalmente devido a variações bruscas e repetidas, por razões climáticas, sazonais ou acidentais (operações de pesca, triagem, armazenamento, transporte) que pode provocar "stress" com consequências graves (de Kinkelin e Hattenberger, 1986).

5.1.6.2 Modificações patológicas provocadas por bioagressores

Vírus, bactérias e parasitas, designados por bioagressores, constituem causas biológicas de doença. Seguidamente resumem-se, para os peixes, as modificações patológicas mais importantes

- Vírus

A virémia primaveril da carpa (V.P.C.), que se manifesta por uma septicemia com edema, hemorragias e necrose renal, provoca uma perturbação fatal do equilíbrio hidromineral e anemia. As viroses septicémicas atingem quase sempre os peixes jovens.

A V.P.C. aparece quando as temperaturas são inferiores a 15°C e a sua designação significa que a sua incidência se verifica apenas na Primavera (Baudouy e col., 1980).

Por outro lado, também foi detectado na carpa o vírus da necrose pancreática infecciosa (N.P.I.) (Dobos e Rowe, 1977; Dorson e col., 1978; Hill, 1982), bem como o vírus da necrose branquial (Popkova e Schelkunov, 1978).

- Bactérias

As doenças dos peixes provocadas por bactérias são do tipo infeccioso, localizadas ou generalizadas (septicemia), normalmente com dominante necro-hemorragica.

Entre as bactérias isoladas em peixes contaminados, é normal distinguir os germes patogénicos estritos e os oportunistas. Os primeiros necessitam de encontrar um hospedeiro conveniente para assegurar o seu desenvolvimento e a sua sobrevivência no meio exterior é apenas um estado de espera. O agente da eritrodermatite e certas estirpes de *Aeromonas hydrophila*, são exemplos deste caso. A maior parte das outras bactérias dos peixes, comportam-se como patogénicos oportunistas e a sua penetração no organismo do peixe só é seguida de doença se o hospedeiro for receptivo, por condições do meio ambiente. Por outro lado, a indução de lesões tegumentares, é frequente em todas as manifestações do peixe no decurso da sua captura, triagem, armazenamento e transporte (Baudouy e Michel, 1980).

Salienta-se ainda que a exposição a concentrações subletais de cobre pode determinar o aumento da receptividade dos animais a várias infecções. No entanto, se esta exposição se prolongar, os animais podem adaptar-se rapidamente reencontrando o seu nível de sensibilidade inicial (Baker e col., 1983).

- Parasitas

O parasitismo é frequente, senão constante nos peixes, mas as doenças parasitárias não se exteriorizam senão quando as condições do meio ambiente permitem a proliferação do parasita. Deste modo, as

parasitoses clínicas são raras no estado natural, mas bastante mais disseminadas em cultura, na medida em que o habitat favorece a transmissão dos portadores e dos hospedeiros intermediários (de Kinkelin e col., 1985).

Assim é importante efectuar o controlo de parasitas nos peixes e evitar as respectivas condições de proliferação, dadas as potenciais consequências para a saúde humana, como por exemplo as helmintoses provocadas por infestação larvar dos peixes, que podem ser graves (Euzéby, 1984).

5.1.7 Valor económico

Embora no nosso país, o valor económico da carpa não seja muito elevado, a sua carne é apreciada em muitos países, como por exemplo, no Norte da Europa, Israel, etc. Devido à fácil fixação de algas do género *Oscillaria* nos seus músculos, apresenta por vezes um gosto a fénico que pode, no entanto, ser eliminado, se as carpas forem mantidas em água pura e bem renovada durante vários dias (Huet, 1978).

A carpa é também considerada uma espécie de interesse na pesca desportiva, visto que a sua captura é difícil, sendo ainda muito utilizada no repovoamento de águas continentais (doces).

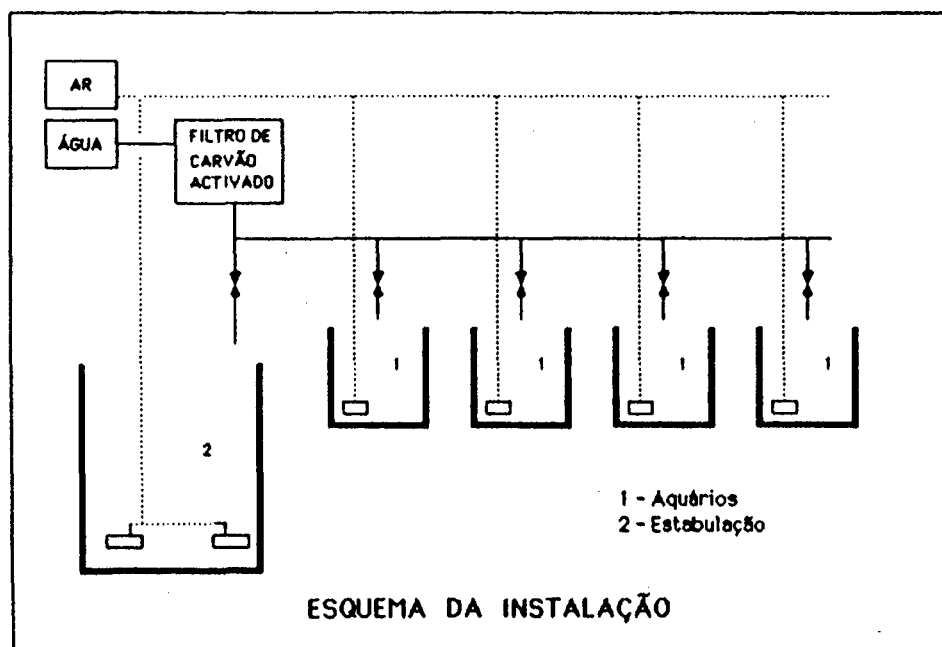


Figura 5.4 - Esquema do dispositivo experimental

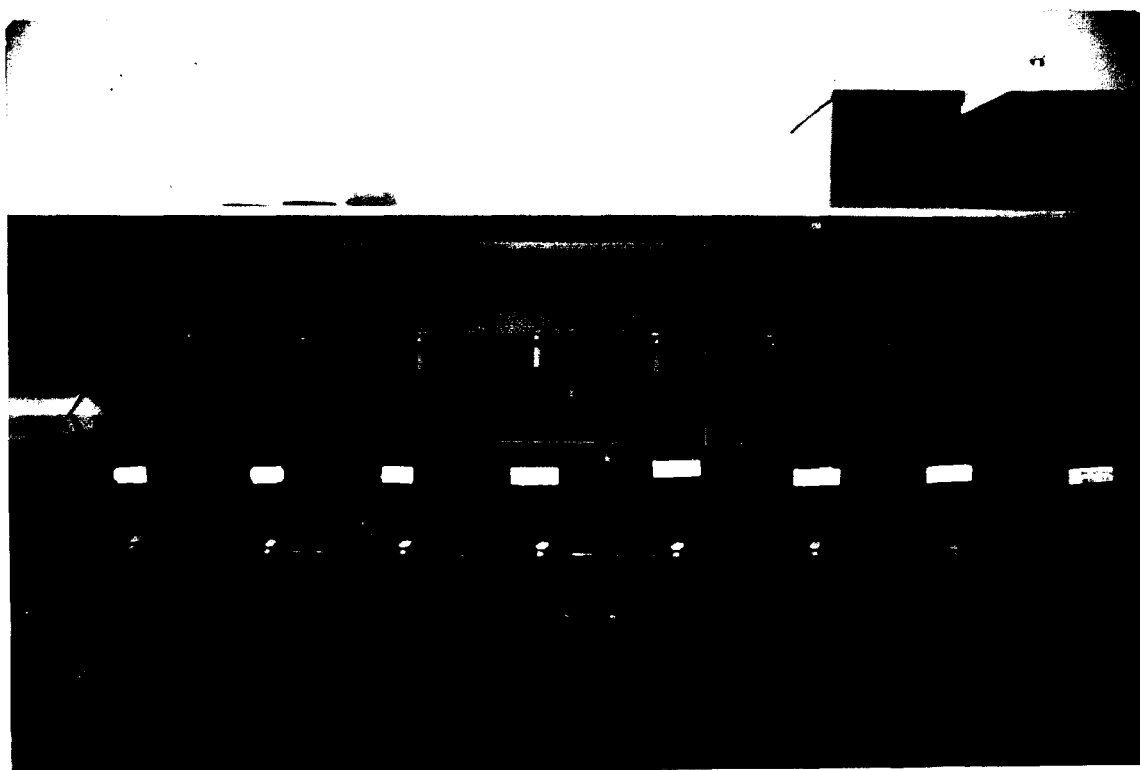


Figura 5.5 - Vista de conjunto do dispositivo experimental

5.2 Dispositivo experimental

O dispositivo experimental utilizado para os testes de toxicidade aguda e crónica foi instalado numa sala a temperatura constante, $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os testes foram realizados com água da rede de abastecimento público, a qual era filtrada através de carvão activado, para remoção de cloro residual. Seguidamente, indicam-se as características principais do dispositivo experimental utilizado:

- 2 tanques de estabulação com 400 l, com estrutura metálica de suporte;
- 12 aquários com 40 l, em polietileno;
- 6 bombas de ar, de saída dupla, e tubagens de fornecimento e descarga de água;
- Instalação de condicionamento de ar.

Na Figura 5.4 mostra-se o esquema do dispositivo experimental, apresentando-se na Figura 5.5 a respectiva vista de conjunto.

5.3 Método experimental

5.3.1 Toxicidade aguda (CL 50-48h)

Adoptou-se o procedimento experimental indicado pelas normas de determinação de toxicidade aguda duma substância em relação a peixes (AFNOR, T95C-doc 54, 1984) (Anexo I).

Os indivíduos utilizados (cerca de 200 por teste) provinham de uma piscicultura próxima, a Estação Aquícola da Azambuja (D.G.S.E.A.), tendo-se mantido esta origem de material biológico para todos os ensaios (Anexo II).

Na realização das experiências manteve-se a classe de tamanho, independentemente da data de obtenção dos indivíduos, visto que, em culturas mais ou menos densas há, normalmente, crescimentos diferentes.

A classe escolhida foi a de 3.5 a 5.5 cm, para um peso variando entre 3.5 e 5.5g.

Após transporte para o laboratório, os peixes eram adaptados às condições experimentais durante duas semanas, que é um período de tempo considerado suficiente para aclimação e observação de eventuais malformações ou doenças (Lloyd, 1965; Mc Donald e col., 1980).

Na estabulação utilizou-se água da rede com as seguintes características médias:

- Dureza total : 100.0 ± 10.0 $\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$;
- Alcalinidade : 70.0 ± 5.0 $\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$;
- pH: 7.8 ± 0.4 ;
- Temperatura : $20^\circ \pm 1^\circ\text{C}$;
- Oxigénio dissolvido: superior a 80% de saturação;
- Cloro residual: 0 mg.l^{-1} .

Durante a estabulação, a água foi arejada, para oxigenação, e mantida à temperatura pretendida para as experiências. A alimentação dos peixes foi efectuada diariamente, sendo interrompida 24 horas antes do início dos testes. Utilizou-se um alimento seco comercial "Tetramin". A água de diluição dos testes, de forma semelhante à da estabulação, era da rede de abastecimento público, após remoção do cloro e ajustamento da dureza ao valor pretendido em cada ensaio. A dureza de 300 mg.l^{-1} em CaCO_3 foi obtida por adição de CaCl_2 e a de 50 mg.l^{-1} em CaCO_3 , por diluição com água bidestilada. O valor do pH da água dos testes variou entre 7.5 e 8.2, tendo sido utilizado na sua determinação um analisador digital de iões da Orion Research, modelo 501.

Os testes tinham a duração de 48 horas, não se procedendo a alimentação nem a oxigenação da água. O oxigénio dissolvido, verificado no final de cada teste, utilizando uma sonda marca Beckman, modelo 02601, situava-se acima de 70% do valor de saturação.

Em cada experiência, correspondente a um valor de dureza utilizaram-se 12 aquários: dois para os ensaios "testemunha" (sem tóxico) e dez para os ensaios de 5 concentrações de cobre (duplicado).

Em cada aquário utilizou-se um lote de 10 indivíduos, tirados ao acaso da população em estabulação, colocados em 10 litros de água. A contaminação dos meios, foi efectuada por diluição de uma solução mãe de Nitrato de Cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a 10^{-1}M , acidificada a 1% com ácido nítrico, utilizando-se água bidestilada na sua preparação.

Considerando que as experiências relativas à toxicidade aguda tinham por objectivo a determinação da CL 50-48h, cada experiência foi precedida de um ensaio preliminar por forma a permitir estudar as concentrações de cobre que conduziram a mortalidades, entre 10 e 100% o que dá uma indicação aproximada da CL 50-48h. Seguidamente, sobre os resultados deste primeiro ensaio, realizaram-se os ensaios definitivos para determinar com precisão a CL 50-48h.

5.3.2 Toxicidade crónica (Subletal)

As experiências de toxicidade crónica foram realizadas utilizando, como doses de intoxicação, concentrações de cobre correspondentes a fracções da CL 50-48h, para as durezas de água previstas. Assim, cada experiência foi precedida pela determinação da CL 50-48h para as respectivas condições de realização (lote de peixes, dureza).

As experiências foram realizadas com um período de intoxicação de três semanas, e utilizando testes semidinâmicos, isto é, com renovação do meio todas as 48 horas. Os organismos foram alimentados 30 minutos antes de cada mudança do meio.

As experiências realizaram-se à temperatura de $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. O pH variou entre 7.9 e 8.2. O meio era previamente saturado em oxigénio por arejamento com ar comprimido. Utilizaram-se 8 aquários com 12 peixes e 10 litros de água cada, sendo dois aquários para cada dureza da água e dois como "testemunha" (sem tóxico).

As concentrações de cobre utilizadas variaram consoante a dureza da água, como a seguir se indica:

Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	CL 50-48h (µg.l ⁻¹)	0.2 CL 50-48h (µg.l ⁻¹)
50±5	115±7	23
100±10	275±13	55
300±20	750±19	150

O estudo da bioacumulação foi efectuado sobre amostras de vários tecidos dos peixes (brânquias, músculo, tubo digestivo e fígado). Dadas as dimensões dos peixes utilizados, a colheita da amostra foi efectuada em três indivíduos, no início do teste e semanalmente. Inicialmente, procedeu-se também à colheita do rim mas, devido ao reduzido peso da amostra conseguida, que não atingia a quantidade mínima requerida para a dosagem, não foi possível efectuar as determinações relativas a este órgão.

A experiência de acumulação foi realizada para uma dada dureza da água (100 mg.l⁻¹ em CaCO₃), e para concentrações de cobre no meio de 0.1, 0.2, 0.3 e 0.4 da CL 50-48h, observando-se a mortalidade e a concentração de cobre nos vários tecidos ao fim de 7, 15, 21 e 28 dias.

Por cada teste realizado em duplicado, dispôs-se de 12 indivíduos em 10 litros de água por aquário. Semanalmente eram retirados três indivíduos para análise. Paralelamente foram seguidos dois testes "testemunha".

Foi ainda realizada uma experiência para estudar a adaptação dos organismos a concentrações crescentes de cobre, adoptando metodologia semelhante à da experiência anterior. Na primeira semana utilizou-se uma concentração de cobre de 0.1 da CL 50-48h, a qual foi incrementada deste valor, em cada semana posterior, até um máximo de 0.4.

5.3.3 Técnicas analíticas

- Espectrofotometria de absorção atómica

As análises quantitativas de cobre na água e nos tecidos dos peixes foram efectuadas através de espectrofotometria de absorção atómica.

A espectrofotometria de absorção e emissão atómica, está normalizada para as dosagens de elementos metálicos em águas (AFNOR, 1983). Esta técnica, permitindo analisar directamente a maior parte das soluções sem extracção selectiva, ou adição de corantes ou de complexantes, reduz significativamente os riscos de contaminação das amostras, oferecendo portanto vantagens importantes relativamente a técnicas de outro tipo. Com efeito, as técnicas colorimétricas, por exemplo, necessitam normalmente de uma preparação elaborada da amostra podendo incluir aquecimento, extracção, filtração, diálise, etc., para além de tratamento químico. Por outro lado, a espectrofotometria de absorção atómica é uma técnica de execução rápida, o que permite aumentar o número de repetições por amostra e consequentemente a precisão dos resultados.

5.3.3.1 Preparação de amostras

5.3.3.1.1 Dosagem de cobre na água

As amostras de água foram recolhidas em tubos de polietileno de 10 ml de capacidade, acidificadas com ácido nítrico a 1%. As dosagens efectuaram-se na água bruta, sem filtração prévia, com excepção dos estudos de evolução da concentração de cobre nos meios. Neste caso, recolhiam-se quatro amostras de 10 ml de cada aquário experimental, filtrando-se duas através de uma porosiade de 0.45 μ , que a seguir eram acidificadas a 1% com ácido nítrico. A dosagem de cobre efectuava-se nas quatro amostras.

5. 3.3.1.2 Dosagem de cobre nos tecidos dos peixes

A dosagem de metais pesados, em material biológico necessita de uma preparação prévia que, normalmente, inclui três fases: pré-mineralização, mineralização e dosagem (Figura 5.6).

Neste trabalho, nas fases 1 e 2 seguiu-se o método proposto por Maarouf (1988). Antes da dissecação os peixes foram mantidos em água durante 24 horas, sendo cada amostra constituída por três indivíduos. As amostras eram então mantidas a 70°C, durante 48 horas, para determinação do respectivo peso seco.

A mineralização foi efectuada a 80°C, durante 24 horas, na presença de ácido nítrico, diluído a 50%. O produto da mineralização obtido era depois diluído, 1:4 (volume). Utilizou-se uma estufa marca Memmert (0°- 250° C).

A dosagem de cobre foi efectuada com um espectrofotómetro de absorção atómica, marca Perkin-Elmer 5000, equipado com uma lâmpada de deutério para correcção da absorção não específica. A dosagem foi efectuada por aferição interna do aparelho através de padrões previamente preparados, obtendo-se as concentrações das amostras por leitura directa. As condições de dosagem foram as seguintes:

Lâmpada de cátodo oco:	5 mA
Comprimento de onda:	324.7 nm
Fenda :	1 nm
Chama:	Ar/Acetileno oxidante.

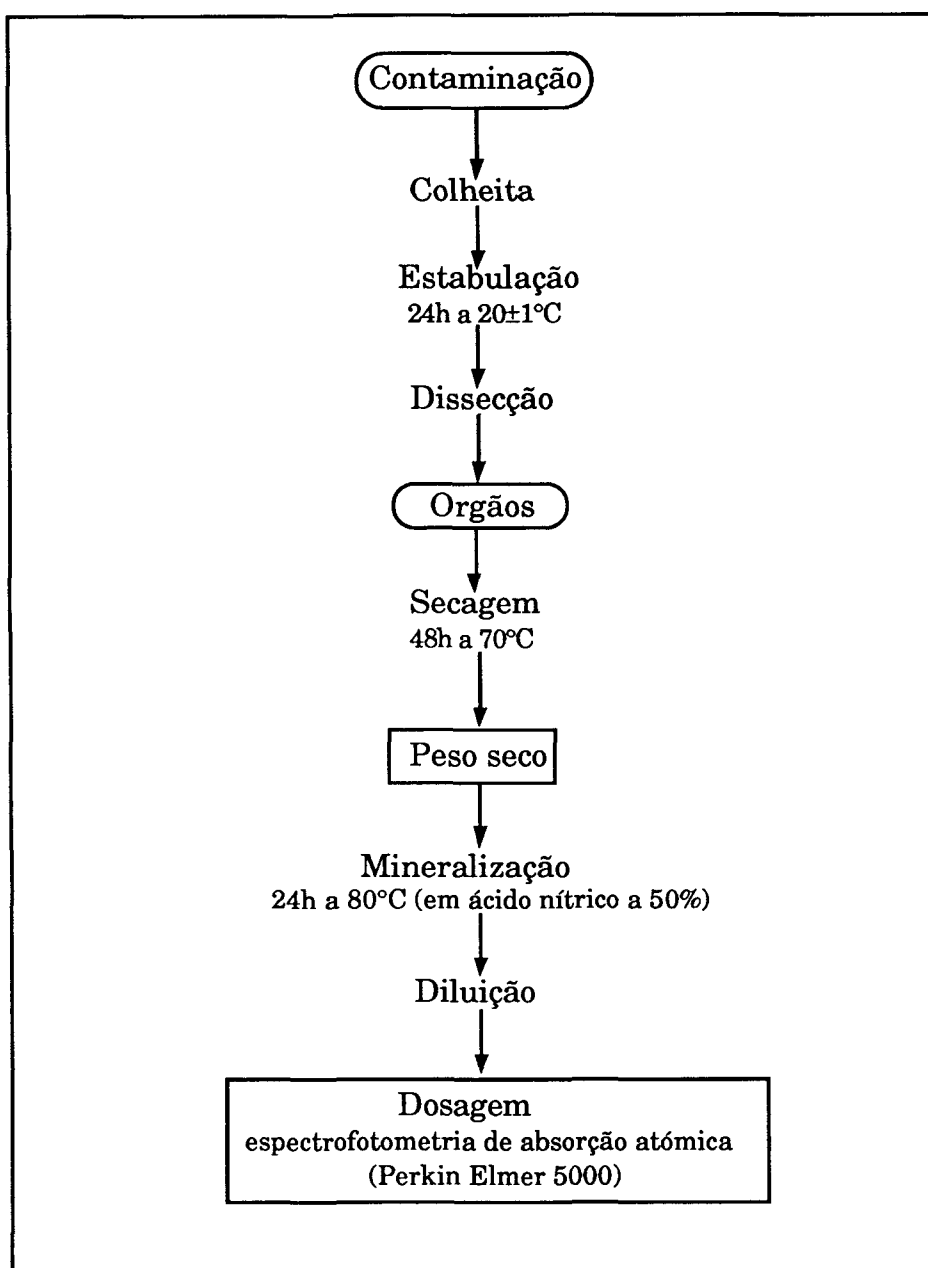


Figura 5.6 - Técnica de preparação do material biológico para dosagem do cobre

5.3.4 Técnicas de histologia, histoquímica e microanálise

5.3.4.1 Histologia topográfica

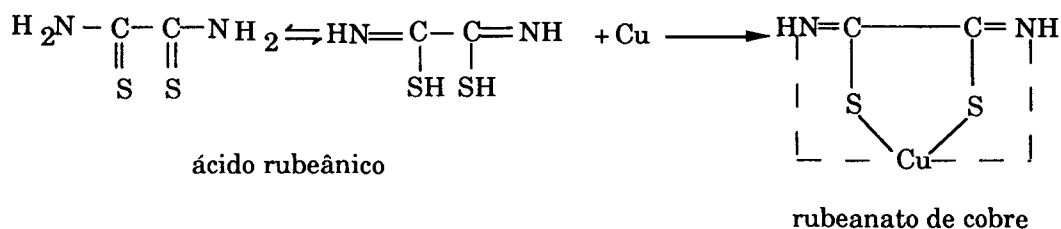
- **Dissecção e fixação:** após dissecção dos organismos, os tecidos removidos (peças histológicas) foram imediatamente fixados em formol neutralizado, durante 24 horas. Esta fixação, para além de evitar a destruição das células pelas suas próprias enzimas, ou por bactérias, visa também o endurecimento dos tecidos, tornando-os mais resistentes às etapas subsequentes da técnica histológica.
- **Inclusão:** a extracção da água presente nos tecidos foi obtida por passagem sucessiva em três banhos de concentrações crescentes de álcool (70%; 95% e puro). Seguidamente a peça foi submetida a três passagens por tolueno, progressivamente mais puro. Após este tratamento as peças foram mergulhadas em parafina fundida (56°-58°C), utilizando-se uma estufa marca Memmert (0°-140°C). Seguidamente, a peça foi incluída em parafina numa quantidade suficiente para a conter convenientemente no seu interior. Assim, utilizaram-se moldes metálicos apoiados em placas de vidro, nas quais se colocava parafina fundida e onde se mergulhava a peça convenientemente orientada.
- **Corte e coloração:** preparado o bloco de parafina, era fixado num suporte metálico devidamente identificado, efectuando-se então os cortes com uma espessura de 7 micra, utilizando um micrótomo rotativo (Leitz, 1512). Estes cortes foram colocados em lâminas de vidro contendo duas ou três gotas de água destilada albuminada. Em seguida as lâminas foram colocadas sobre uma placa metálica aquecida a 41-43°C, por forma aos cortes se distenderem e secarem na posição adequada. Após a secagem, procedeu-se à coloração dos cortes para o exame histológico e histopatológico, utilizando-se os seguintes corantes:
 - Hematoxilina-eosina, que mostra os núcleos em azul-violeta, o citoplasma celular em vermelho ou rosa mais ou menos intenso, o colagénio em rosa muito pálido e as fibras elásticas em rosa vivo;

- Tricrômico de Masson (variante de Goldner), que segundo Martoja e Martoja(1967) possui o melhor corante nuclear (hematoxilina de Groat). Os núcleos apresentam-se corados de negro, os citoplasmas acidófilos e os nucléolos em rosa e as secreções apresentam-se vermelhas ou verdes. Os músculos coram de vermelho e as fibras de colagêneo de verde;
- Tricrômico "num tempo". Este método apresenta sobre os tricrômicos clássicos a vantagem de ser bastante mais rápido. Os núcleos e a maior parte dos citoplasmas coram de vermelho, as fibras conjuntivas de verde e os eritrócitos de amarelo;
- Coloração de Van-Gieson, que mostra os núcleos e os ergastoplasmas em negro, os citoplasmas acidófilos em amarelo e as fibras elásticas em vermelho;
- Azul de Alcian (segundo Mowry), permite a detecção dos mucopolissacarídeos ácidos. Estas substâncias coram de azul.

5.3.4.2 Histoquímica

• Repartição do cobre

Para a detecção de cobre nos vários tecidos dos organismos, utilizaram-se os métodos da ditizona e do ácido rubeânico. No primeiro, o cobre é detectado pelos complexos castanhos que forma com a ditizona. Apesar do método não ser considerado específico do cobre, visto que a ditizona pode formar complexos com outros metais, nalguns casos permitiu obter resultados satisfatórios. No segundo método, o ácido rubeânico forma com os sais do metal um composto insolúvel, verde escuro, de rubeanato de cobre, como a seguir se indica (Gauter e Jollès, 1970).



Teoricamente, a reacção do ácido rubeânico não é específica do cobre, uma vez que o ácido pode também formar complexos com o cobalto e com o níquel. No entanto, como os complexos destes metais são de cor diferente (amarelo-acastanhado para o cobalto, azul-violeta para o níquel), não interferem portanto com a detecção de cobre.

A reacção ao ácido rubeânico foi aplicada a fragmentos de tecidos dos órgãos fixados em formol, sendo os cortes efectuados após a inclusão em parafina.

Cada corte era desparafinado em tolueno, colocando-se em seguida sobre um cristizador contendo ácido clorídrico concentrado, durante 15 minutos. Em seguida, efectuava-se a lavagem com álcool absoluto durante 15 minutos. O corte era então transferido para uma solução a 0.1% de ácido rubeânico em álcool a 70%, durante 10 minutos. A esta solução eram adicionados 200 mg de acetato de sódio por cada 100 ml, deixando o corte permanecer na solução durante 24 a 48 horas. Seguidamente o corte era transferido para álcool a 70°, onde permanecia entre 60 a 90 minutos, após agitação inicial. Finalmente o corte era colocado em álcool absoluto, durante 24 horas, sendo depois passado sucessivamente por dois banhos de tolueno, efectuando-se em seguida a montagem em lâminas.

- Polissacarídeos

Estes compostos podem encontrar-se livres ou ligados a proteínas. Nos organismos, o único polissacarídeo não ligado a proteína é o glicogénio que é evidenciado pela reacção do ácido periódico - Schiff, conhecido por P.A.S. (Periodic Acid-Schiff). Essa reacção baseia-se na acção oxidante do ácido periódico sobre os agrupamentos 1-2 glicol, produzindo agrupamentos aldeídos. Estes agrupamentos, por sua vez, reagem com a fucsina descorada (reagente de Schiff), dando um composto de adição, corado e insolúvel. Os compostos PAS-positivos são corados de vermelho.

Como existem na célula outros constituintes que podem reagir com o reagente de Schiff, a especificidade da reacção é obtida por tratamento prévio do corte com uma enzima glicogenolítica (amilase salivar). Nos

cortes as estruturas que contêm glicogénio coram pelo P.A.S., não apresentando coloração após tratamento com a amilase salivar.

5.3.4.3 Microanálise por impacto laser

Adoptou-se a técnica de microanálise por impacto laser com o objectivo de confirmar as observações de detecção histoquímica do cobre (cristais negro-esverdeados de rubeanato de cobre).

O princípio da análise é destrutivo. Cada impacto laser volatiliza um microvolume da preparação e os iões gerados no microplasma são seguidamente analisados por espectrometria de massa. O LA.M.M.A. (Laser Microprobe Mass Analysis) compreende um laser de potência Néodyme-yag quádrupla, um laser piloto Helium-Neon, um microscópio óptico, um sistema de visualização UV, uma câmara de ionização, um grupo de bombagem e um espectrómetro de massa.

A preparação das amostras foi realizada segundo o procedimento prático proposto por Crochard:

- Para verificação das detecções histoquímicas, a preparação das amostras é idêntica à que se utilizou em histologia. Os cortes realizados para a pesquisa histoquímica foram novamente cortados à dimensão pretendida, montados sobre grelhas duplas em níquel e analisados através do LA.M.M.A.

Tratando-se de secções espessas e coloridas, a visualização dos pontos de impacto do feixe laser é consequentemente facilitada. A microanálise foi efectuada num aparelho LA.M.M.A. 500 (Leybod-Heraeus).

5.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

5.4.1 Critério de avaliação da toxicidade do cobre

A toxicidade do cobre estima-se pela determinação da concentração letal para 50% de um lote de peixes de uma população homogénea, após um período de 48 horas (CL 50-48h).

Os cálculos foram efectuados segundo o método dos "probits" (Litchfield e Wilcoxon, 1949), utilizando o programa de EFFDOS (Moureteau, 1989). A recta de correlação dos "probits" empíricos e dos logaritmos das concentrações de cobre, permite determinar os valores das CL 50-48h para as diferentes durezas (Anexo III).

A CL 50-48h apresenta-se normalmente com o respectivo intervalo de confiança (CL 50-s, CL 50+s) (Ramade, 1977), sendo "s" o desvio padrão.

5.4.2. Critério de avaliação da retenção do cobre

A espectrofotometria de absorção atómica permite uma avaliação directa das concentrações das soluções determinadas em mg.l⁻¹, que se exprimem em mg.Kg⁻¹ ou em µg.g⁻¹ através da formula seguinte:

$$C(\mu\text{g.g}^{-1}) = \frac{c(\mu\text{g.l}^{-1}) \cdot V(\text{l})}{PS(\text{g})}$$

C - concentração de cobre nos tecidos dos peixes, expressa em µg.g⁻¹ de peso seco.

c - concentração de cobre no mineralizado, expressa em µg.l⁻¹

V - volume do mineralizado em litros

PS - peso seco da amostra mineralizada, em g.

Para caracterizar a cinética de acumulação a maioria dos autores utilizam o factor de concentração (FC), o factor de poluição (FP) ou o índice de concentração (IC%), que seguidamente se definem:

FC - Factor de concentração (Baudin, 1977)

$$FC = \frac{C(\text{mg.Kg}^{-1})}{C'(\text{mg.l}^{-1})}$$

FP - Factor de poluição

$$FP = \frac{C(\text{mg.Kg}^{-1})}{C_i(\text{mg.Kg}^{-1})}$$

IC% - Indice de concentração (Amiard-Triquet e col., 1986)

$$IC\% = \frac{FC}{FC_t} \times 100$$

C - Concentração de cobre nos peixes, em mg.Kg^{-1} PS

C' - concentração de cobre no meio, em mg.l^{-1}

C_i - concentração inicial de cobre nos peixes, em mg.Kg^{-1}

FC_t - factor de concentração nos peixes testemunha.

6. RESULTADOS

A apresentação e discussão de resultados foi elaborada separadamente para cada uma das fases experimentais, por se considerar que desta forma resulta mais clara a respectiva exposição. Assim, os resultados estão reagrupados em três capítulos.

O primeiro, apresenta os resultados do estudo da toxicidade do cobre em relação a *Cyprinus carpio* L. através da determinação da respectiva CL 50-48h, propondo um valor para a Concentração Máxima Admissível de Tóxico (Fase Experimental I). O segundo, é relativo ao estudo de acumulação de cobre nos órgãos estudados, bem como da adaptação do organismo ao tóxico (Fase Experimental II e III). A repartição e localização de cobre nos tecidos do organismo é objecto do terceiro capítulo, no qual se apresentam os estudos histológicos e microanalíticos.

6.1 INTOXICAÇÃO AGUDA: CL 50-48h

6.1.1 Apresentação

Os resultados obtidos, de acordo com a metodologia anteriormente indicada para a determinação da CL 50-48h do cobre para *Cyprinus carpio* L., são apresentados nas Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3, sendo a primeira relativa ao tóxico de referência (dicromato de potássio). Nas Tabelas restantes, indicam-se os valores da CL 50-48h obtidos para estudar a influência da dureza e do pH da água. Em ambos os casos, os valores apresentados, dizem respeito a material biológico recolhido em diferentes períodos do ano.

Tabela 6.1- Variação sazonal da CL 50-24h do tóxico de referência ($K_2Cr_2O_7$) para *Cyprinus carpio* L. ($K_2Cr_2O_7$)

MESES	CL 50-24h, $\mu g.l^{-1}$ ($K_2Cr_2O_7$)
Abril	556.0×10^3
Setembro	591.9×10^3
Dezembro	549.6×10^3
Valor Médio	566.0×10^3

Dureza = $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$

Tabela 6.2 - Variação sazonal da CL 50-48h do cobre para *Cyprinus carpio* L. a diferentes durezas da água

	CL 50-48 h, $\mu\text{g.l}^{-1}$ (95% IC)		
	DUREZA, $\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$		
	50	100	300
PRIMAVERA	113 (96 - 131)	271 (249 - 294)	752 (736 - 768)
	103 (91 - 118)	280 (257 - 305)	754 (741 - 7 67)
VERÃO	103 (90 - 118)	258 (232 - 288)	941 (928 - 954)
	110 (94 - 128)	301 (279 - 326)	960 (946 - 974)
OUTONO	104 (88 - 123)	279 (260 - 299)	462 (448 - 476)
	104 (90 - 120]	273 (246 - 302)	462 (447 - 477)
INVERNO	122 (104 - 142)	314 (289 - 341)	844 (382 - 857)
	128 (109 - 151)	297 (278 - 317)	845 (832 - 858)
VALOR MÉDIO	111 (103 - 128)	284 (271 - 314)	752 (462 - 960)

pH = 7-8

Tabela 6.3 - Variação sazonal da CL 50-48h do cobre para *Cyprinus carpio* L. a valores extremos de pH da água (respectivamente 5 e 9)

	CL 50-48h, $\mu\text{g.l}^{-1}$ (95% IC)	
	pH	
	5	9
VERÃO	277 (256-300)	356 (328 - 386)
	285 (264 - 308)	366 (333 - 403)
INVERNO	301 (280 - 323)	351 (323 - 381)
	297 (278 - 317)	328 (303 - 356)
VALOR MÉDIO	290 (277- 301)	350 (328 - 366)

Dureza = 100 mg.l^{-1} CaCO_3

6.1.2 Exploração e discussão

Como se pode verificar pelos resultados apresentados, a variação anual da CL 50-24h do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foi pouco significativa, situando-se entre 556.0 mg.l⁻¹ (Abril) e 591.9 mg.l⁻¹ (Setembro), com um valor médio de 566.0 mg.l⁻¹. Assim, não se reteve qualquer factor de correcção, pois o respectivo valor médio foi aproximadamente igual a 1 (556.0/556.0=1.01 em Abril; 566.0/591.9=0.95 em Setembro; 566.0/549.6=1.02 em Dezembro). Este resultado indica que a sensibilidade do material utilizado nos ensaios era significativamente estável, o que parece ser consequência de terem sido utilizados organismos sempre da mesma origem. O factor de correcção determinado considera-se bastante satisfatório, quando comparado com os que resultam de valores de CL 50-24h indicados noutros estudos. Efectivamente, à CL 50-24h ($K_2Cr_2O_7$) indicada para a dáfnia (AFNOR T90-301, 1974), compreendida entre 0.9x10⁻³ µg.l⁻¹ e 1.5x10⁻³ µg.l⁻¹, ou à média da CL 50-24h ($K_2Cr_2O_7$) para *Brachydanio rerio* (AFNOR T90-303, 1978), da ordem dos 265x10⁻³ µg.l⁻¹, correspondem elevados factores de correcção.

Os resultados obtidos permitem identificar uma variação sazonal do valor da CL 50-48h do cobre, com especial incidência para a dureza de 300 mg.l⁻¹ CaCO₃, constatando-se que o valor obtido no Verão é aproximadamente 2 vezes superior ao do Outono. Esta variação é semelhante à encontrada por Alabaster e Lloyd (1980), que indicam que a toxicidade é mais importante no Inverno do que no Verão. No entanto, segundo Lydy e Wissing (1988), a CL 50-48h pode aumentar do Inverno para a Primavera, como demonstram os resultados que obtiveram para as espécies *Etheostoma flabellare* e *Etheostoma nigrum*, admitindo que a variação seja devida a mudanças nas reservas de energia dos peixes ou, eventualmente, a diferenças no estado reprodutivo do peixe no momento de cada teste.

Na Tabela 6.4, comparam-se os valores da CL 50-48h de salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e os que foram determinados no presente trabalho, portanto relativos a ciprinídeos. Constata-se que *Cyprinus carpio* L. tem aproximadamente a mesma sensibilidade que *Salmo gairdneri* para uma dureza da água de 50 mg.l⁻¹ CaCO₃, sendo comparativamente mais resistente para valores de dureza da água de 100

e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃, que é a faixa habitual de dureza de águas de ciprinídeos.

Tabela 6.4 - Comparação das CL 50-48h do cobre para salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e ciprinídeos (presente estudo).

Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	CL 50-48h, µg.l ⁻¹	
	Salmonídeos	Ciprinídeos
10	25	
50	110	111
100	200	284
300	560	752

Na Figura 6.1, mostra-se a variação da CL 50-48h do cobre com a dureza da água, para *Cyprinus carpio* L. representando graficamente os resultados apresentados na Tabela 6.2.

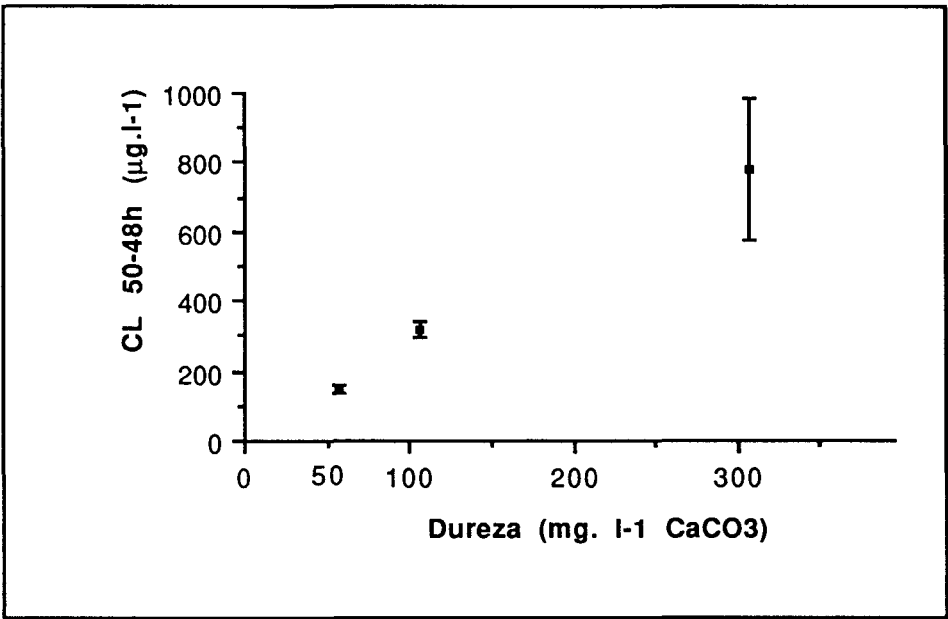


Figura 6.1 - Influência da dureza na CL 50-48h de cobre para *Cyprinus carpio* L.

Verifica-se que o valor da CL 50-48h aumenta com o valor da dureza, o que é principalmente devido à influência do cálcio na biodisponibilidade do tóxico. Com efeito, a toxicidade do cobre depende das formas químicas em que se encontra no meio (Chakoumakos e col., 1979) (tóxicas: Cu^{2+} , CuOH^+ e CuOH_2^0 ; não tóxicas, carbonatadas: CuHCO_3^+ , CuCO_3^0 e $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$), cujo equilíbrio, embora sendo principalmente influenciado pela alcalinidade e pelo pH, depende também da disponibilidade de aniões inorgânicos. A concentração destes iões depende da dureza (Miller e Mackay, 1980) e, consequentemente a quantidade de Cu^{2+} livre. No entanto, o trabalho de Bradley e Sprague (1985), relativo à toxicidade aguda de zinco para a truta arco-íris, mostra que mantendo a especiação do metal invariável, a respectiva toxicidade decresceu com o aumento da dureza. Por outro lado, Calamari e col. (1980) utilizando concentrações de metal na forma livre semelhantes e durezas diferentes verificaram que a mortalidade variava, concluindo que todas as formas inorgânicas contribuem para a toxicidade. No caso da dureza, e concretamente do cálcio, crê-se que as variações de toxicidade sejam induzidas por efeitos fisiológicos no peixe, principalmente pela alteração da permeabilidade das brânquias, como é referido em diversos estudos (Potts e Fleming, 1971; Cuthbert e Maetz, 1972), tendo Pagenkopk (1983) admitido que se verifique competição entre o cálcio e o metal tóxico para formarem ligações ao nível daquele órgão.

Na Figura 6.2 mostra-se a correlação existente entre os valores de CL 50-48h e os da dureza correspondente, efectuando a transformação logarítmica de ambas as variáveis, de modo análogo ao que é proposto por Brown (1968). Por regressão linear obteve-se a expressão a seguir indicada, do mesmo tipo da que é proposta por Spear e Pierce (1979), embora esta seja respeitante à CL 50-96h.

$$C = -2.6638 + 1.0289 D \quad (a)$$

C - CL 50-48h (mg.l^{-1})

D - dureza ($\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$)

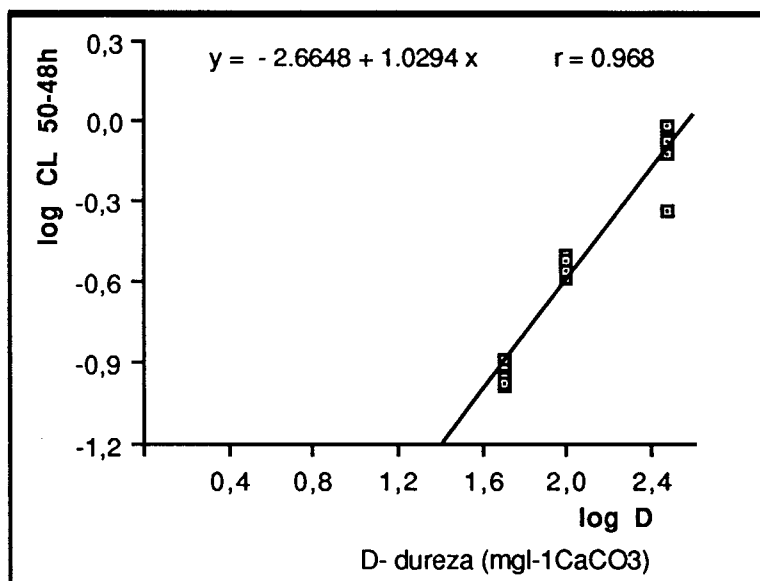


Figura 6.2 - Variação da CL 50-48h em função da dureza

Comparando os valores observados das médias das CL 50-48h para as três durezas estudadas com os que foram estimados utilizando a expressão (a), verifica-se uma correlação significativa ($r=0.97$), como se mostra na Figura 6.3.

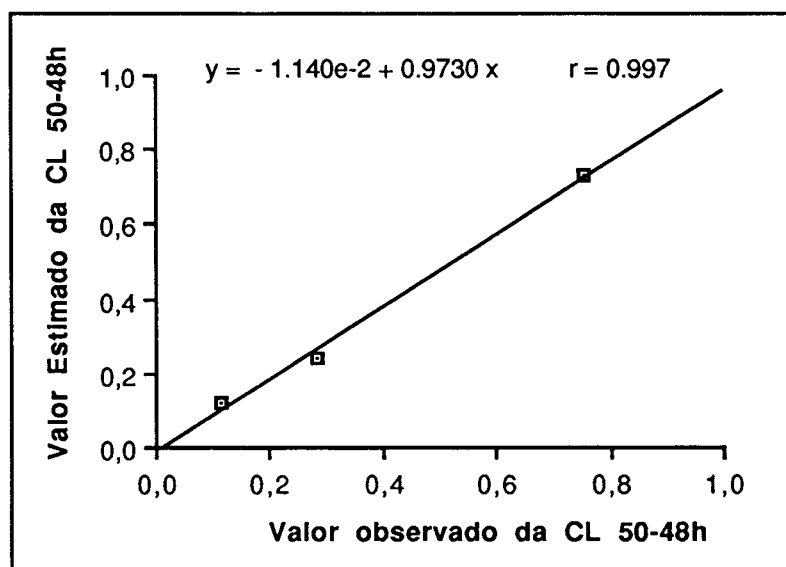


Figura 6.3 - Variação dos valores estimados e observados da CL 50-48h

Através dos resultados obtidos para a CL 50-48h adoptando dois valores diferentes de pH do meio, verifica-se que a toxicidade aguda do cobre para *Cyprinus carpio* L. diminui com o aumento do pH. Constata-se

assim uma variação semelhante à que foi observada noutros estudos (Waiwood, 1977; Howarth, 1976), bem como por Hughes e Nemcsók (1988) que referem que a acidificação do meio potencia a toxicidade dos metais, causando distúrbios nos processos fisiológicos e bioquímicos dos peixes. Admite-se que o aumento de toxicidade resulte da libertação de Cu^{2+} no meio, em consequência da presença de H^+ . No entanto, refere-se que Miller e Mackay (1980), mostraram que para valores de pH inferiores a 5, não há efeito sinérgico com a toxicidade, contrariamente ao que seria de esperar, visto que àqueles valores de pH não deverá existir em solução qualquer cobre inorganicamente complexado e, portanto, deverá ser máxima a concentração de Cu^{2+} , a forma química de cobre considerada de maior toxicidade. Os referidos autores admitem que o antagonismo resulte da resposta fisiológica do peixe, traduzida por segregação de maiores quantidades de muco, cuja componente proteica pode ligar-se com o metal tóxico.

Embora os valores obtidos de CL 50-48h do cobre para *Cyprinus carpio* L. sejam superiores aos que são indicados noutros estudos (Levesque, 1979), como, por exemplo, o valor de CL 50-10d de cobre para a carpa comum, de $180 \mu\text{g.l}^{-1}$ a uma dureza da água de $250 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$, pode considerar-se que os valores determinados têm ordem de grandeza semelhante à indicada para outras espécies, como se mostra na Tabela 6.5.

Tabela 6.5 - Valores da CL 50-48h de cobre a diferentes durezas para ciprinídeos

Organismo	CL 50 de cobre (µg.l ⁻¹)				Ref ^a
	Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)				
	50	100	200	300	
<i>Cyprinus carpio</i>	111	284		752	Presente estudo
<i>Carassius auratus</i>	43			610	Pickering e Henderson (1966) Tsai e Mckee (1980)
<i>Brachydanio rerio</i>		167	250		Fogels e Sprague (1977) Bellawere e Gorbi (1981)
<i>Pimephales promelas</i>	28			1500	Pickering e Henderson (1966)

Admite-se que a variação dos valores seja devida a falta de uniformidade nas condições de execução dos diferentes trabalhos, quer resultante dos organismos utilizados, quer das características da água, as quais podem alterar radicalmente as formas químicas em que o tóxico se apresenta e, ou as correspondentes respostas fisiológicas dos organismos. Assim, pensa-se que as características da água a utilizar em testes de toxicidade deveriam ser normalizadas. Neste estudo, as determinações de CL 50-48h, foram efectuadas com condições bem definidas por forma a permitir uma interpretação e comparação de resultados mais rigorosa.

Apesar de se reconhecerem as limitações dos ensaios laboratoriais para avaliação de toxicidade, sendo aceite que o seu valor é comparativamente inferior em condições naturais, principalmente devido a fenómenos de complexação e de precipitação (EIFAC/T27, 1976), considera-se que aqueles ensaios continuam a constituir um meio eficaz para a fixação de teores máximos de tóxico aceitáveis.

Adoptando a metodologia proposta por Alabaster e Lloyd (1980), comparam-se na Tabela 6.6 e na Figura 6.4, as concentrações máximas aceitáveis de tóxico para salmonídeos e ciprinídeos, com base nos valores apresentados na Tabela 6.4. Verifica-se que, para a dureza de 50 mg.l⁻¹ CaCO₃, o valor da concentração máxima aceitável de tóxico é idêntico para ambas as categorias de peixes. No entanto, para as durezas de 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃, constata-se que o referido valor é superior para ciprinídeos (Peres e Pihan, 1991).

Tabela 6.6 - Comparação da concentração máxima aceitável de tóxico para salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e ciprinídeos (presente estudo), respectivamente 0.05 e 0.2 da CL 50-48h para 50% e 95% das frequências anuais.

Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	Concentração Máxima Aceitável de Tóxico (µg.l ⁻¹)			
	F.50%		F.95%	
	Salmonídeos	Ciprinídeos	Salmonídeos	Ciprinídeos
10	1.0		5.0	
50	6.0	6.0	22.0	24.0
100	10.0	14.5	40.0	58.0
300	28.0	37.5	112.0	150.0

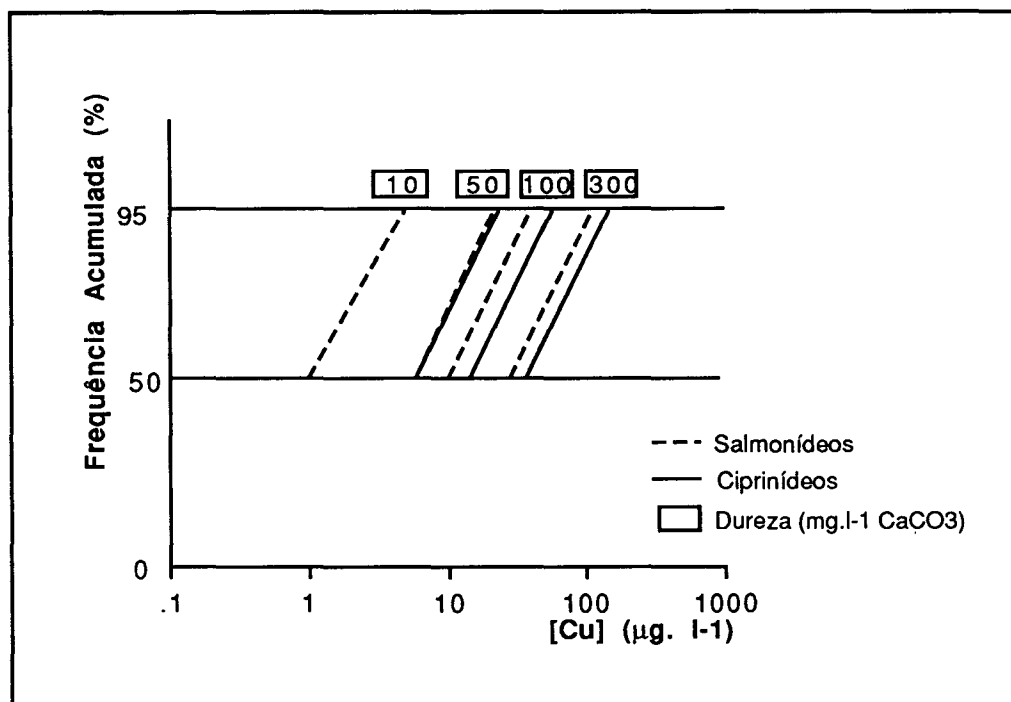


Figura 6.4 - Comparação da concentração máxima aceitável de tóxico para salmonídeos (Alabaster e Lloyd, 1980) e ciprinídeos (presente estudo)

Face à representatividade da espécie *Cyprinus carpio* L., relativamente aos ciprinídeos, à predominância desta classe de peixes em rios de segunda categoria e tendo em conta as suas características, propícias à sua utilização como material biológico em ensaios laboratoriais, propõe-se que para a determinação da concentração máxima aceitável de cobre em ciprinídeos, seja adoptada a referida espécie. Este procedimento poderia ser de grande utilidade, facilitando o preenchimento de lacunas ainda existentes nos dispositivos normativos, relativamente a descargas de produtos tóxicos em meios naturais. Com efeito, os dados disponíveis sobre peixes não salmonídeos são particularmente insuficientes, a tal ponto que a Directiva Comunitária de 78/07/18, relativa à qualidade das águas piscícolas, ainda não distingue salmonídeos e ciprinídeos.

6.2 INTOXICAÇÃO SUBLETAL. BIOACUMULAÇÃO. ADAPTAÇÃO

6.2.1 Apresentação

Nas Tabelas 6.7 a 6.10, apresentam-se os valores das concentrações de cobre nos diferentes órgãos de *Cyprinus carpio* L. (brânquias, músculo, tubo digestivo e fígado), para cada dureza testada e a uma concentração de cobre na água de 0.2 da respectiva CL 50-48h, durante três semanas (Fase experimental II). Nestas experiências não se verificou mortalidade. Nas Tabelas 6.11 a 6.14, indicam-se os valores das concentrações de cobre nos diferente órgãos de *Cyprinus carpio* L. a uma dureza da água de 100 mg.l⁻¹ CaCO₃ e a quatro doses de intoxicação, durante quatro semanas (Fase experimental III). Nestas experiências, para as doses de intoxicação mais elevadas, respectivamente, 0.3 e 0.4 da CL 50-48h, verificou-se uma mortalidade de 100% ao fim de duas semanas.

Tabela 6.7 - Concentração de cobre (µg.g⁻¹ peso seco±σ) nas brânquias de *Cyprinus carpio* L. expostas a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas,a diferentes durezas da água (CaC03 mg.l⁻¹)

Dureza (mg.l ⁻¹)	Período de exposição (semanas)				Conc. na água (µg. ml ⁻¹)	
	0 (*)	1	2	3	Real	Teórica
50	12.7 ± 1.3	35.1 ± 4.5	42.6 ± 3.1	53.3 ± 3.1	0.02 ± 0.01	0.023
100	13.1 ± 1.5	35.5 ± 2.2	71.4 ± 6.5	58.5 ± 2.4	0.04 ± 0.01	0.055
300	12.2 ± 0.8	32.6 ± 3.7	69.7 ± 7.2	77.9 ± 8.5	0.12 ± 0.06	0.150

(*) Testemunha

Tabela 6.8 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no músculo de *Cyprinus carpio* L. exposto a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Período de exposição (semanas)				Conc. na água ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	
	0 (*)	1	2	3	Real	Teórica
50	7.5 ± 0.6	12.8 ± 1.4	14.5 ± 1.1	11.9 ± 0.4	0.02 ± 0.01	0.023
100	7.9 ± 0.7	16.5 ± 2.2	26.1 ± 2.9	24.9 ± 2.7	0.04 ± 0.01	0.055
300	6.7 ± 1.1	17.2 ± 1.0	24.1 ± 1.1	26.6 ± 2.9	0.12 ± 0.06	0.150

(*) Testemunha

Tabela 6.9 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no tubo digestivo de *Cyprinus carpio* L. exposto a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Período de exposição (semanas)				Conc. na água ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	
	0 (*)	1	2	3	Real	Teórica
50	17.2 ± 1.7	36.4 ± 4.8	52.3 ± 3.5	55.8 ± 3.5	0.02 ± 0.01	0.023
100	16.7 ± 2.4	34.7 ± 4.3	50.4 ± 3.5	39.1 ± 3.8	0.04 ± 0.01	0.055
300	20.3 ± 0.9	87.5 ± 13.7	132.6 ± 11.1	80.1 ± 13.4	0.12 ± 0.06	0.150

(*) Testemunha

Tabela 6.10- Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no fígado de *Cyprinus carpio* L. exposto a 0.2 de CL 50-48h de cobre na água, durante 3 semanas, a diferentes durezas da água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Período de exposição (semanas)				Conc. na água ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	
	0 (*)	1	2	3	Real	Teórica
50	69.8 \pm 7.0	178.6 \pm 9.6	207.6 \pm 13.1	210.1 \pm 16.8	0.02 \pm 0.01	0.023
100	66.7 \pm 5.0	160.0 \pm 14.5	292.1 \pm 18.6	257.1 \pm 19.9	0.04 \pm 0.01	0.055
300	68.3 \pm 5.2	190.1 \pm 17.1	320.6 \pm 13.7	368.0 \pm 20.4	0.12 \pm 0.06	0.150

(*) Testemunha

Tabela 6.11 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) nas brânquias de *Cyprinus carpio* L. expostas a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas

Nível de exposição ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Período de exposição (semanas)			
	1	2	3	4
Branco	16.2 \pm 2.4	16.4 \pm 1.8	15.9 \pm 2.0	16.2 \pm 2.1
0.1 CL 50 (28)	28.1 \pm 5.2	37.1 \pm 3.7	41.6 \pm 5.3	40.9 \pm 3.1
0.2 CL 50 (56)	51.9 \pm 8.0	64.2 \pm 3.2	61.3 \pm 9.1	62.5 \pm 8.1
0.3 CL 50 (84)	68.1 \pm 9.3	81.2 \pm 14.1	*	*
0.4 CL 50 (112)	71.7 \pm 12.8	94.7 \pm 17.4	*	*

* 100% de mortalidade

CL 50-48h: 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Dureza da água: 100 mg.l^{-1} (CaCO_3)

Tabela 6.12 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no músculo de *Cyprinus carpio* L. exposto a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas

Nível de exposição ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Período de exposição (semanas)			
	1	2	3	4
Testemunha	6.3 \pm 0.3	7.2 \pm 0.6	7.8 \pm 0.3	6.7 \pm 0.2
0.1 CL 50 (28)	11.4 \pm 0.7	21.6 \pm 2.4	32.0 \pm 2.3	33.4 \pm 3.0
0.2 CL 50 (56)	20.8 \pm 2.4	29.7 \pm 2.5	46.4 \pm 3.3	49.2 \pm 3.0
0.3 CL 50 (84)	32.4 \pm 3.6	57.3 \pm 5.4	*	*
0.4 CL 50 (112)	39.7 \pm 2.2	58.2 \pm 5.3	*	*

* 100% de mortalidade

CL 50-48h: 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Dureza da água: 100 mg.l^{-1} (CaCO_3)

Tabela 6.13 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no tubo digestivo de *Cyprinus carpio* L. exposto a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas

Nível de exposição ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Período de exposição (semanas)			
	1	2	3	4
Testemunha	16.7 \pm 0.7	20.9 \pm 2.2	18.2 \pm 1.9	16.6 \pm 1.0
0.1 CL 50 (28)	41.4 \pm 4.6	65.8 \pm 6.9	119.1 \pm 11.4	120.0 \pm 10.1
0.2 CL 50 (56)	64.3 \pm 6.5	78.9 \pm 8.4	136.3 \pm 7.8	129.8 \pm 9.9
0.3 CL 50 (84)	84.9 \pm 8.1	101.4 \pm 11.6	*	*
0.4 CL 50 (112)	96.9 \pm 7.1	122.2 \pm 12.6	*	*

* 100% de mortalidade

CL 50-48h: 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Dureza da água: 100 mg.l^{-1} (CaCO_3)

Tabela 6.14 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) no fígado de *Cyprinus carpio* L. exposto a diferentes frações de CL 50-48h na água, durante 4 semanas

Nível de exposição ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Período de exposição (semanas)			
	1	2	3	4
Testemunha	63.4 \pm 6.4	66.2 \pm 6.9	61.1 \pm 5.1	67.1 \pm 6.2
0.1 CL 50 (28)	138.7 \pm 10.0	232.4 \pm 18.2	439.8 \pm 22.4	443.1 \pm 20.5
0.2 CL 50 (56)	173.4 \pm 19.61	297.2 \pm 17.04	472.7 \pm 18.9	479.6 \pm 21.2
0.3 CL 50 (84)	237.7 \pm 13.9	357.1 \pm 20.2	*	*
0.4 CL 50 (112)	320.0 \pm 16.4	443.2 \pm 20.3	*	*

* 100% de mortalidade

CL 50-48h: 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Dureza da água: 100 mg.l^{-1} (CaCO_3)

Na Tabela 6.15 apresentam-se os valores da concentração de cobre, em diferentes órgãos de *Cyprinus carpio* L. exposto a frações crescentes da CL 50-48h durante quatro semanas.

Tabela 6.15 - Concentração de cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) em diferentes tecidos de *Cyprinus carpio* L. exposto a frações crescentes de CL 50-48h na água, durante 4 semanas

Órgãos	Semanas de exposição (frações da CL 50)				
	0 (*)	1 (0.1 CL 50)	2 (0.2 CL 50)	3 (0.3 CL 50)	4 (0.4 CL 50)
Brânquia	16.2 \pm 1.7	32.8 \pm 2.0	69.2 \pm 6.7	87.5 \pm 14.0	97.5 \pm 6.1
Músculo	7.5 \pm 0.5	11.7 \pm 1.0	30.1 \pm 2.5	49.7 \pm 3.2	53.4 \pm 2.8
Tubo digestivo	18.2 \pm 2.0	43.2 \pm 4.7	79.4 \pm 8.6	148.2 \pm 9.4	157.4 \pm 14.4
Fígado	65.6 \pm 6.9	142.3 \pm 9.8	294.3 \pm 16.8	463.7 \pm 20.5	497.9 \pm 22.5

CL 50-48h: 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Dureza da água: 100 mg.l^{-1} (CaCO_3)

(*) Testemunha

Os valores das concentrações de cobre, nos quatro órgãos estudados, expostos a 0.2 da CL 50-48h de cobre na água, para diferentes valores de pH são apresentados na Tabela 6.16.

Tabela 6.16 - Concentração de Cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco $\pm\sigma$) em tecidos de *Cyprinus carpio* L. exposto a 0.2 da CL 50-48h de cobre na água durante 1 semana variando os valores de pH na água

Orgãos	Testemunha		0.2 CL 50-48h				
	pH5	pH8	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
Brânquia	12.1 \pm 1.2	16.6 \pm 1.7	51.5 \pm 2.4	42.8 \pm 5.2	59.1 \pm 2.6	67.1 \pm 4.6	59.2 \pm 4.8
Músculo	6.9 \pm 0.3	7.2 \pm 0.3	12.8 \pm 0.9	17.6 \pm 1.8	17.3 \pm 1.6	20.8 \pm 1.1	13.3 \pm 1.2
Tubo dig.	16.7 \pm 1.9	20.9 \pm 1.1	101.4 \pm 10.4	96.9 \pm 6.6	102.2 \pm 10.4	140.0 \pm 9.4	122.2 \pm 11.8
Fígado	64.6 \pm 2.9	56.6 \pm 3.1	238.8 \pm 13.9	227.1 \pm 15.4	215.0 \pm 15.8	242.5 \pm 19.9	258.7 \pm 19.6

CL 50-48h: 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Dureza da água: 100 mg.l^{-1} (em CaCO_3)

Nas Tabelas 6.17 a 6.28, indicam-se os factores de concentração (FC), os factores de poluição (FP) e os índices de concentração (IC %) de cobre nos diferentes órgãos de *Cyprinus carpio* L., durante três semanas a diferentes durezas da água (50, 100 e 300 mg.l^{-1} CaCO_3) (Fase Experimental II).

Tabela 6.17 - Factores de concentração (FC) de cobre nas brânquias de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ durante 3 semanas a diferentes durezas de água (CaCO_3 mg.l^{-1})

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição			
	0 (*)	1	2	3
50	254	1755	2130	2665
100	262	887	1785	1462
300	244	271	580	649

(*) Testemunha

Tabela 6.18 - Factores de Poluição (FP) de cobre nas brânquias de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	2.76	3.35	4.19
100	2.70	5.45	4.46
300	2.67	5.71	6.38

Tabela 6.19 - Índices de concentração (IC%) de cobre nas brânquias de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	675	819	1025
100	341	686	562
300	104	223	249

Tabela 6.20 - Factores de concentração (FC) de cobre no músculo de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição			
	0 (*)	1	2	3
50	150	640	725	595
100	158	412	652	622
300	134	123	200	221

(*) Testemunha

Tabela 6.21 - Factores de Poluição (FP) de cobre no músculo de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	1.70	1.93	1.58
100	2.08	3.30	3.15
300	2.56	3.59	3.97

Tabela 6.22 - Índices de concentração (IC%) de cobre no músculo de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	426	483	396
100	275	601	470
300	95	133	147

Tabela 6.23 - Factores de concentração (FC) de cobre no tubo digestivo de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição			
	0 (*)	1	2	3
50	344	1820	2615	2790
100	334	867	1260	977
300	406	729	1105	667

(*) Testemunha

Tabela 6.24 - Factores de Poluição (FP) de cobre no tubo digestivo de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	2.11	3.04	3.24
100	2.07	3.01	2.34
300	4.31	6.53	3.94

Tabela 6.25 - Índices de concentração (IC%) de cobre no tubo digestivo de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	505	726	775
100	240	350	271
300	202	306	185

Tabela 6.26 - Factores de concentração (FC) de cobre no fígado de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição			
	0 (*)	1	2	3
50	1396	8930	10380	10505
100	1334	4000	7302	6427
300	1366	1584	2671	3066

(*) Testemunha

Tabela 6.27 - Factores de Poluição (FP) de cobre no fígado de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	2.55	2.97	3.01
100	2.39	4.37	3.85
300	2.78	4.69	5.38

Tabela 6.28 - Índices de concentração (IC%) de cobre no fígado de *Cyprinus carpio* L. exposto a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, durante 3 semanas, a diferentes durezas de água ($\text{CaCO}_3 \text{ mg.l}^{-1}$)

Dureza (mg.l^{-1})	Semanas de exposição		
	1	2	3
50	654	760	769
100	293	534	470
300	116	195	224

6.2.2 Exploração e discussão

Através dos ensaios de intoxicação subletal, foi possível comparar a acumulação do cobre em vários tecidos de *Cyprinus carpio* L. como se mostra nas Figuras 6.5, 6.6 e 6.7.

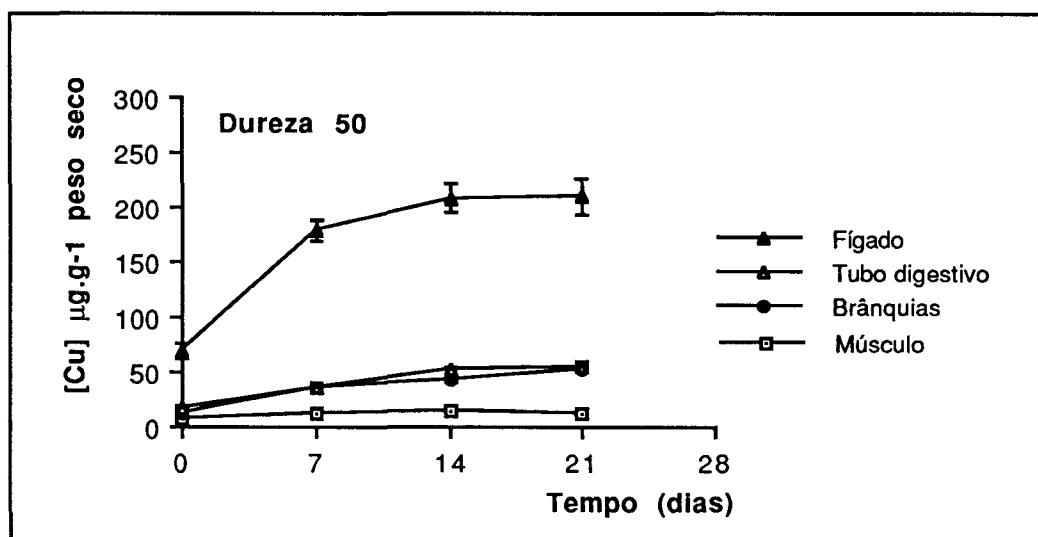


Figura 6.5 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nos diferentes tecidos durante 3 semanas para a dureza da água de 50mg.l⁻¹ CaCO₃

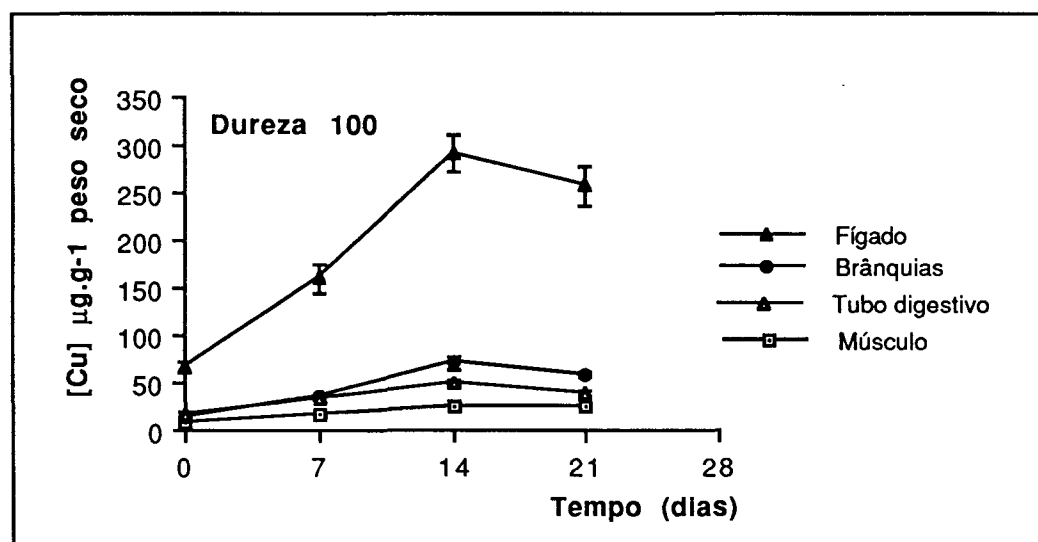


Figura 6.6 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nos diferentes tecidos durante 3 semanas para a dureza da água de 100mg.l⁻¹ CaCO₃

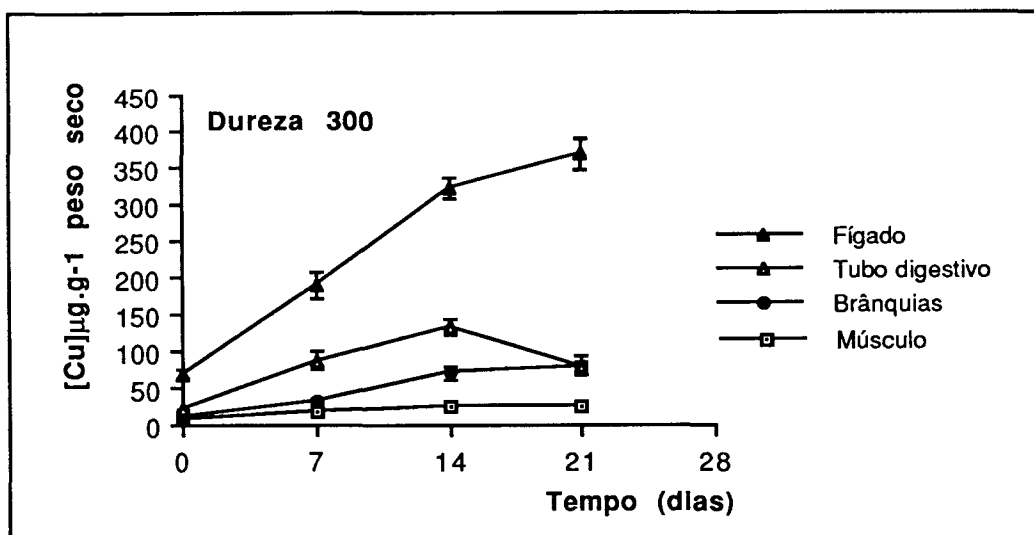


Figura 6.7 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nos diferentes tecidos durante 3 semanas para a dureza da água de 300mg.l⁻¹ CaCO₃

Constata-se que, para os três níveis de dureza testados, as concentrações mais elevadas de cobre são observadas no fígado, sendo no músculo que se detectam os valores mais baixos.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos (Stokes, 1979) admitindo-se que a variação da acumulação seja devida à metalotionina que se forma no fígado, a qual aumenta com a concentração de metal presente no meio (Roch e col., 1982, Roch e McCarter, 1984 a,b). Com efeito, na presença de um metal é induzida a formação de metalotionina, através da síntese de teonina e da ligação da apoproteína com o metal (Hamilton e Mehrle, 1986), variando a afinidade da ligação com os metais (Zn < Cd < Cu < Hg) (Probst, 1979). Assim, a toxicidade dos metais manifestar-se-á quando for excedida a capacidade da metalotionina para formar ligações metálicas, permitindo que os iões em excesso causem lesões patológicas, situação que é normalmente descrita como "spillover hypothesis". Dada a relação existente entre a síntese de metalotionina e os processos de intoxicação foi sugerido que aquela proteína constitua um indicador biológico da pressão ambiental, devido a contaminação metálica (Olafson e col., 1979 b; Shaikh e Hirayama, 1979).

Nas Figuras 6.8, 6.9 e 6.10, mostra-se a acumulação de cobre nos organismos, tomando como base o valor da CL 50-48h para as

respectivas durezas, verificando-se que é para a dureza de 50 mg.l⁻¹ de CaCO₃ que as concentrações relativas são mais elevadas.

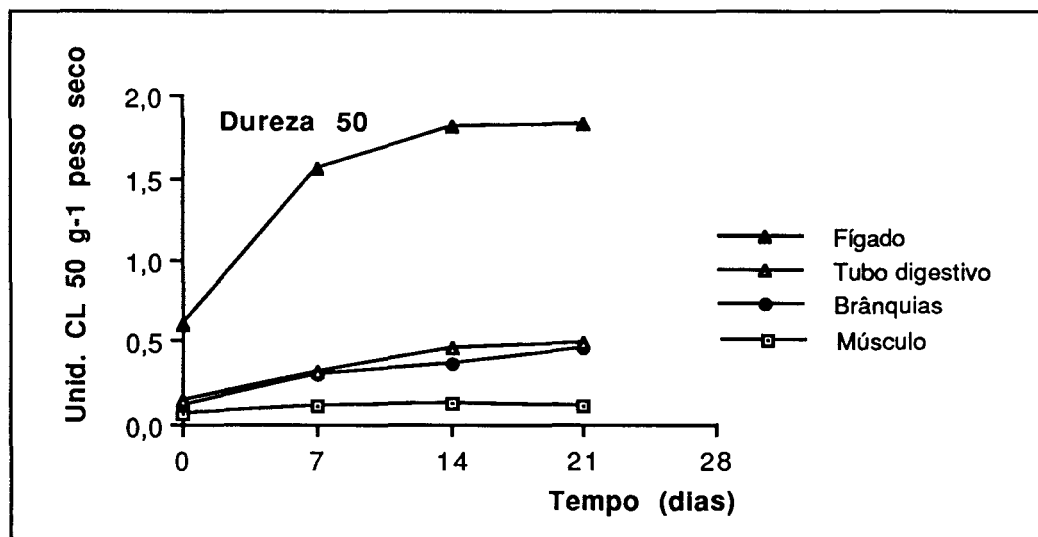


Figura 6.8 - Acumulação relativa de cobre nos diferentes tecidos em função da CL 50-48h durante 3 semanas para a dureza da água de 50 mg.l⁻¹ CaCO₃

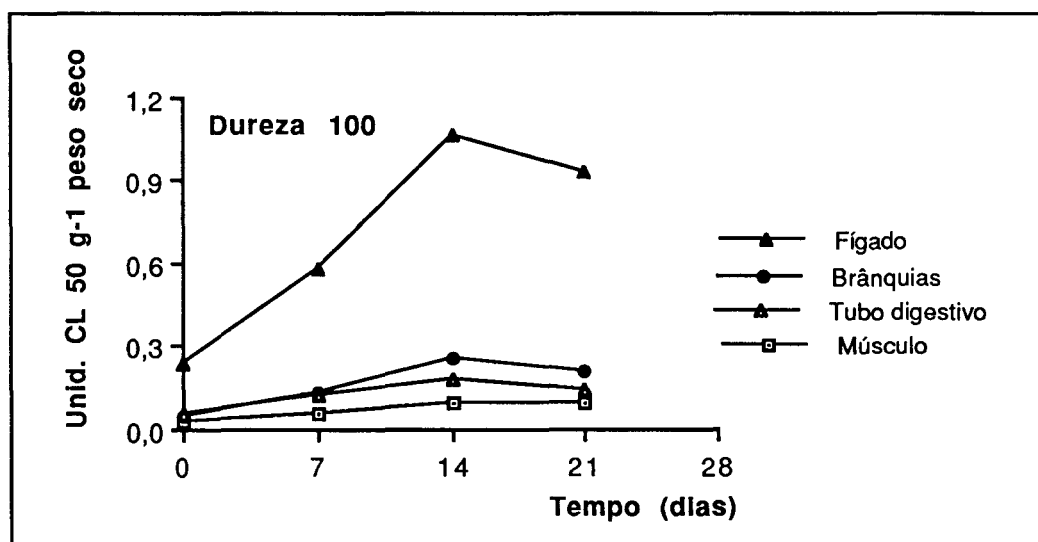


Figura 6.9 - Acumulação relativa de cobre nos diferentes tecidos em função da CL 50-48h durante 3 semanas para a dureza da água de 100 mg.l⁻¹ CaCO₃

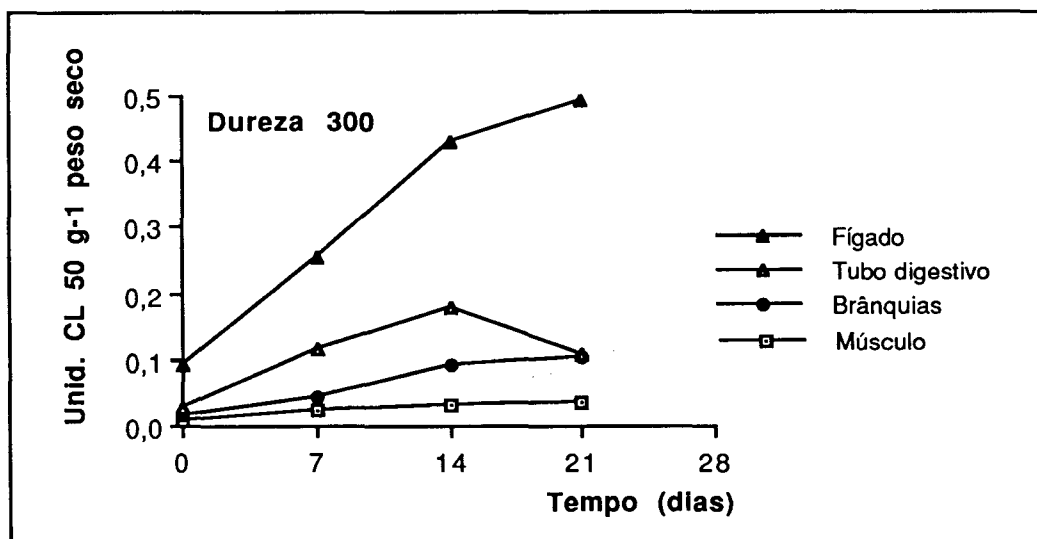


Figura 6.10 - Acumulação relativa de cobre nos diferentes tecidos em função da CL 50-48h durante 3 semanas para a dureza da água de 300 mg.l⁻¹ CaCO₃

Para melhor identificar o efeito da dureza na acumulação de cobre nos diferentes tecidos, elaboraram-se as Figuras 6.11 a 6.14. É assim possível verificar que a dureza influencia as concentrações de cobre detectadas em todos os órgãos (brânquias (Peres e Pihan, 1991 b), músculo, tubo digestivo e fígado), sendo no fígado que, relativamente aos restantes, se observam as concentrações mais elevadas. Verifica-se, portanto, que o aumento da dureza se traduz por uma maior acumulação de cobre nos tecidos, o que deverá resultar do efeito protector do cálcio. Com efeito, embora a alcalinidade seja um factor importante para o equilíbrio das formas químicas em que o metal se encontra no meio, determinando a quantidade da forma iónica livre (mais tóxica), Miller e Mackay (1980) mostram que, não se tratando de águas excessivamente duras, a dureza cálcica é mais importante do que a alcalinidade relativamente à toxicidade do cobre. O efeito referido parece resultar da alteração que o cálcio provoca na permeabilidade das brânquias, regulando a quantidade de metal tóxico que tem acesso ao organismo (Calamari e col., 1980).

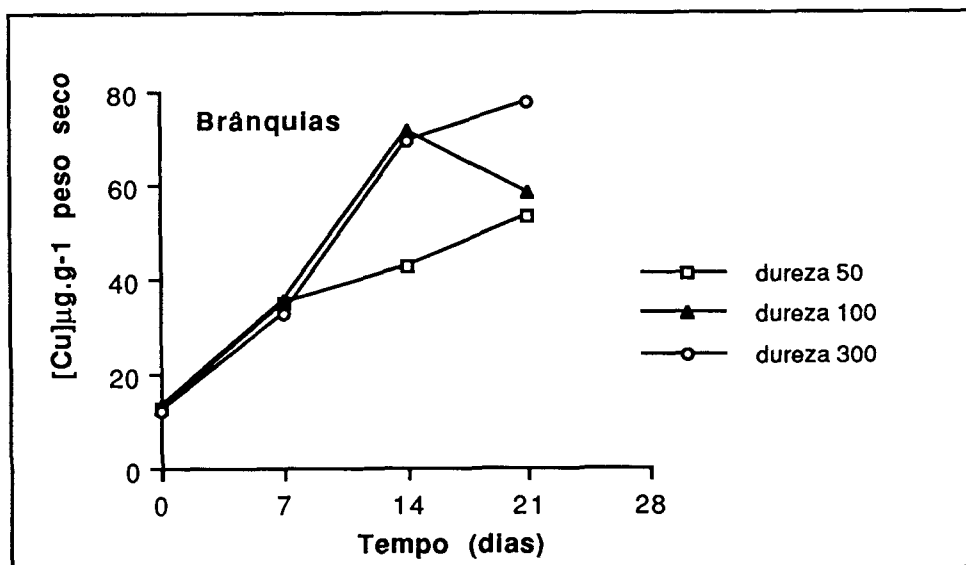


Figura 6.11 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) nas brânquias (Experiência 2, Fase Experimental II)

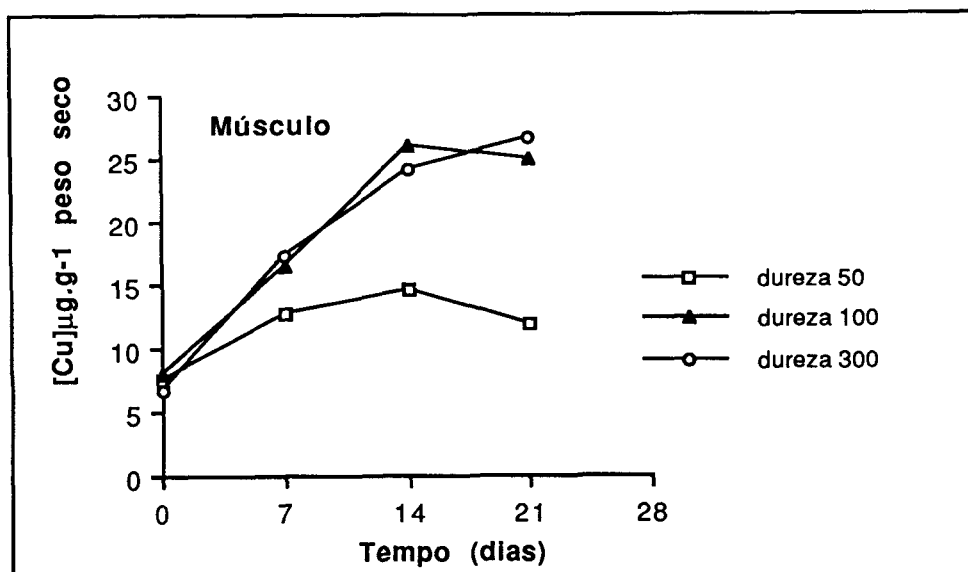


Figura 6.12 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) no músculo (Experiência 2, Fase Experimental II)

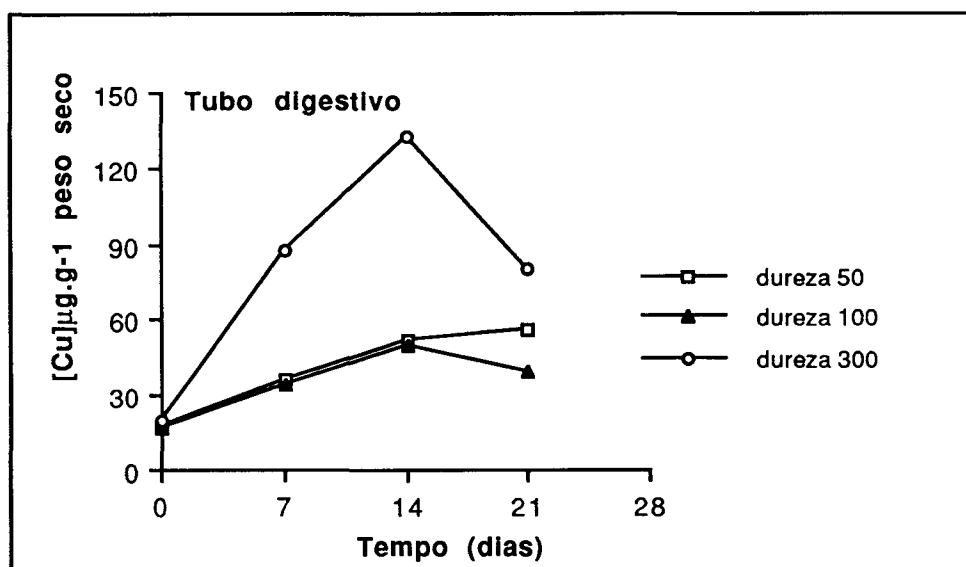


Figura 6.13 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) no tubo digestivo (Experiência 2, Fase Experimental II)

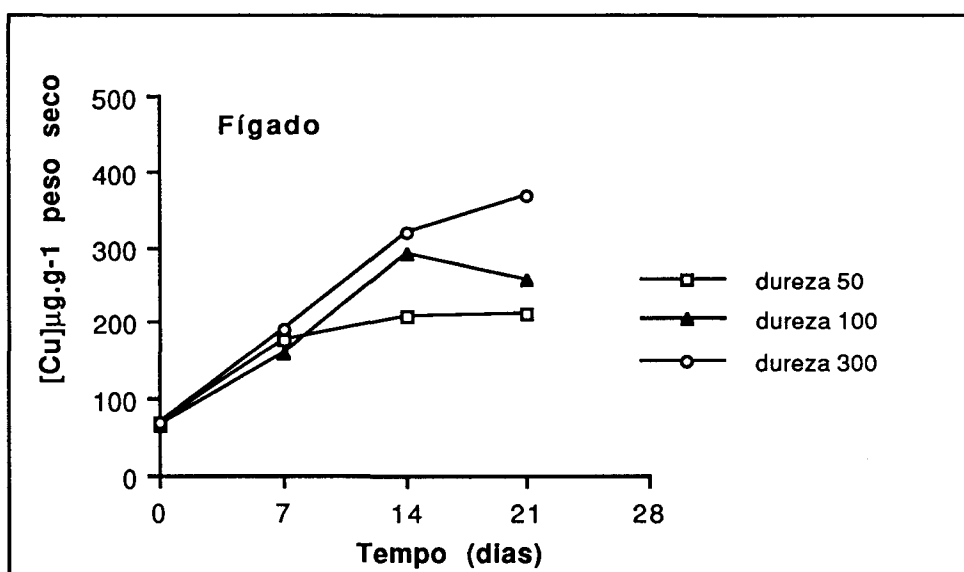


Figura 6.14 - Acumulação de cobre (0.2 da CL 50-48h) no fígado (Experiência 2, Fase Experimental II)

Com os resultados obtidos nas experiências 2 da Fase Experimental II, calcularam-se os factores de concentração, os factores de poluição e os índices de concentração, cuja variação se mostra nas Figuras 6.15 a 6.18. Constata-se que a variação do factor de concentração é mais importante para o fígado, atingindo o máximo para a dureza 50 mg.l⁻¹ CaCO₃ e o mínimo, no músculo, para a dureza 300 mg.l⁻¹ CaCO₃.

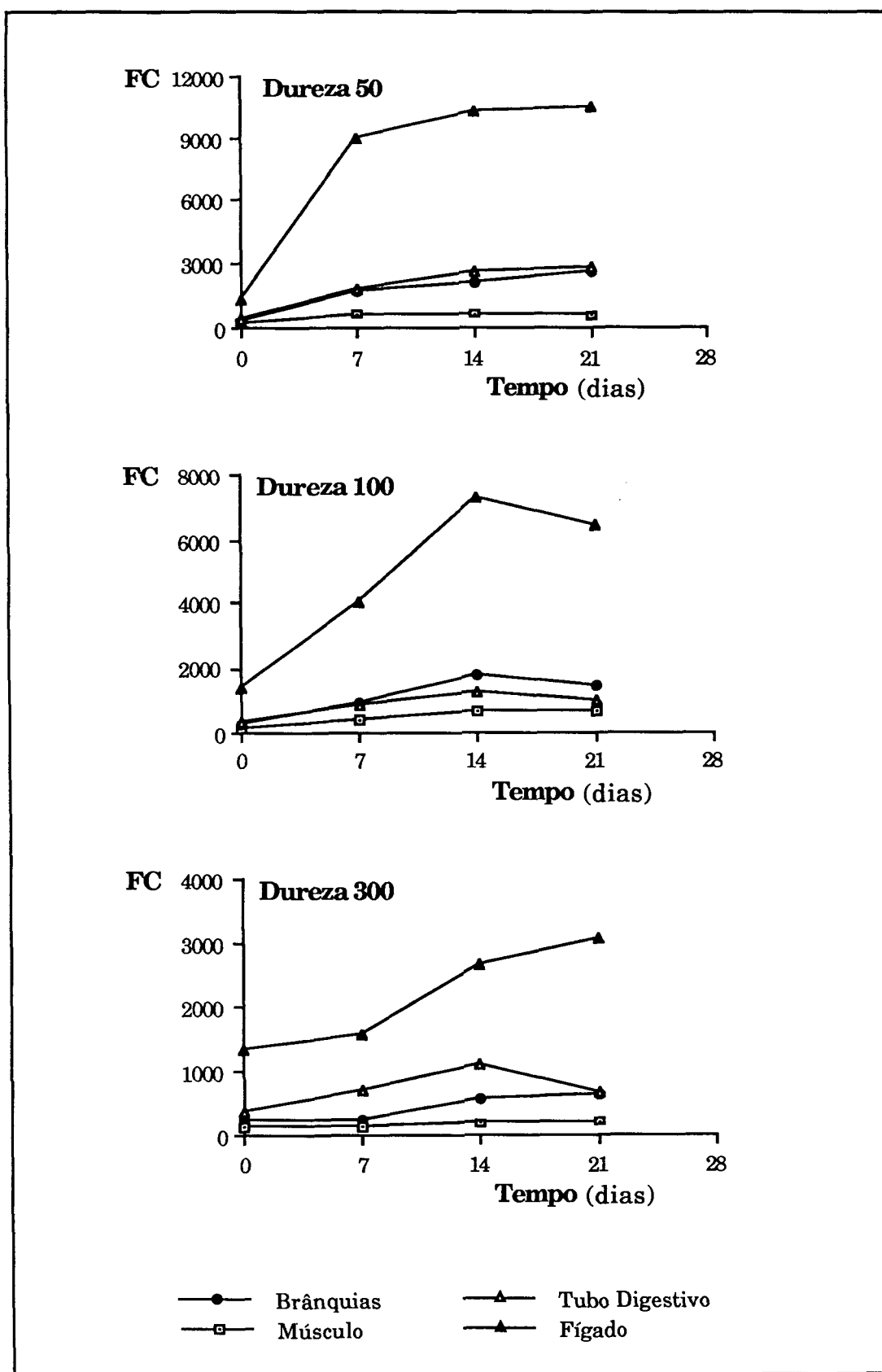


Figura 6.15 - Factores de concentração nos diferentes tecidos, para as três durezas de água testadas (50, 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃)

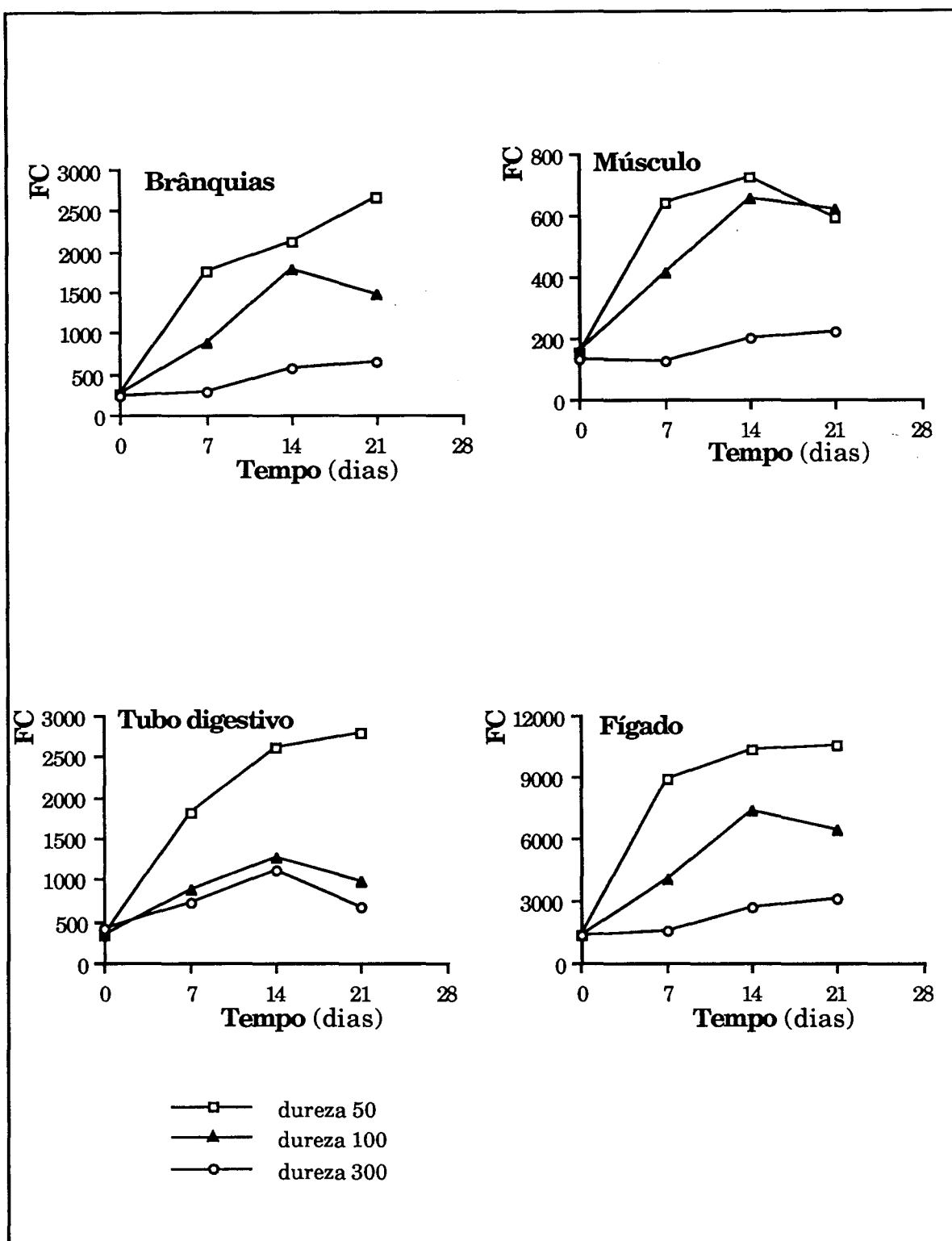


Figura 6.16 - Factores de concentração nos diferentes órgãos para as três durezas de água testadas (50, 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃)

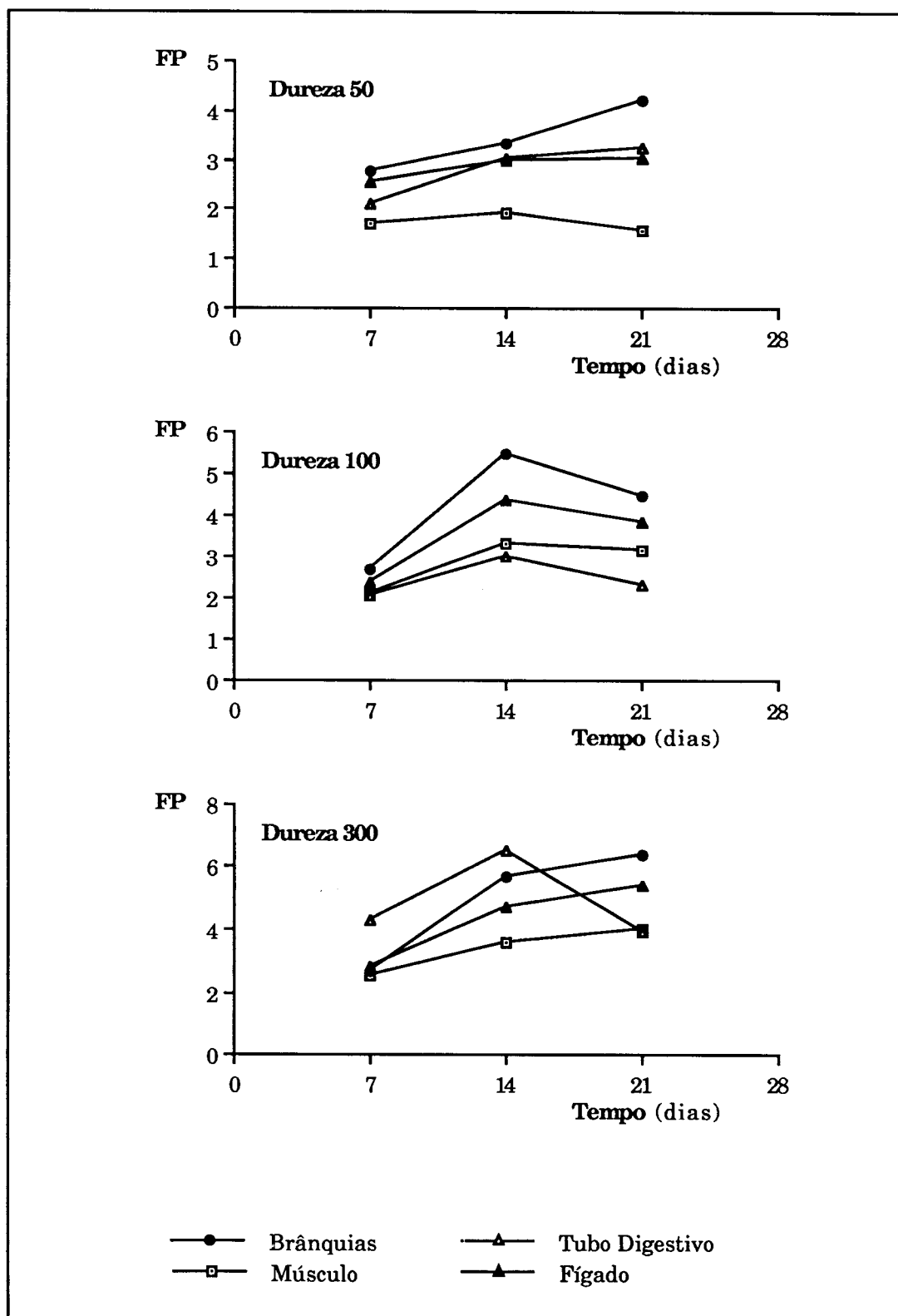


Figura 6.17 - Factores de Poluição nos diferentes tecidos, para as três dureza de água testadas (50, 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃)

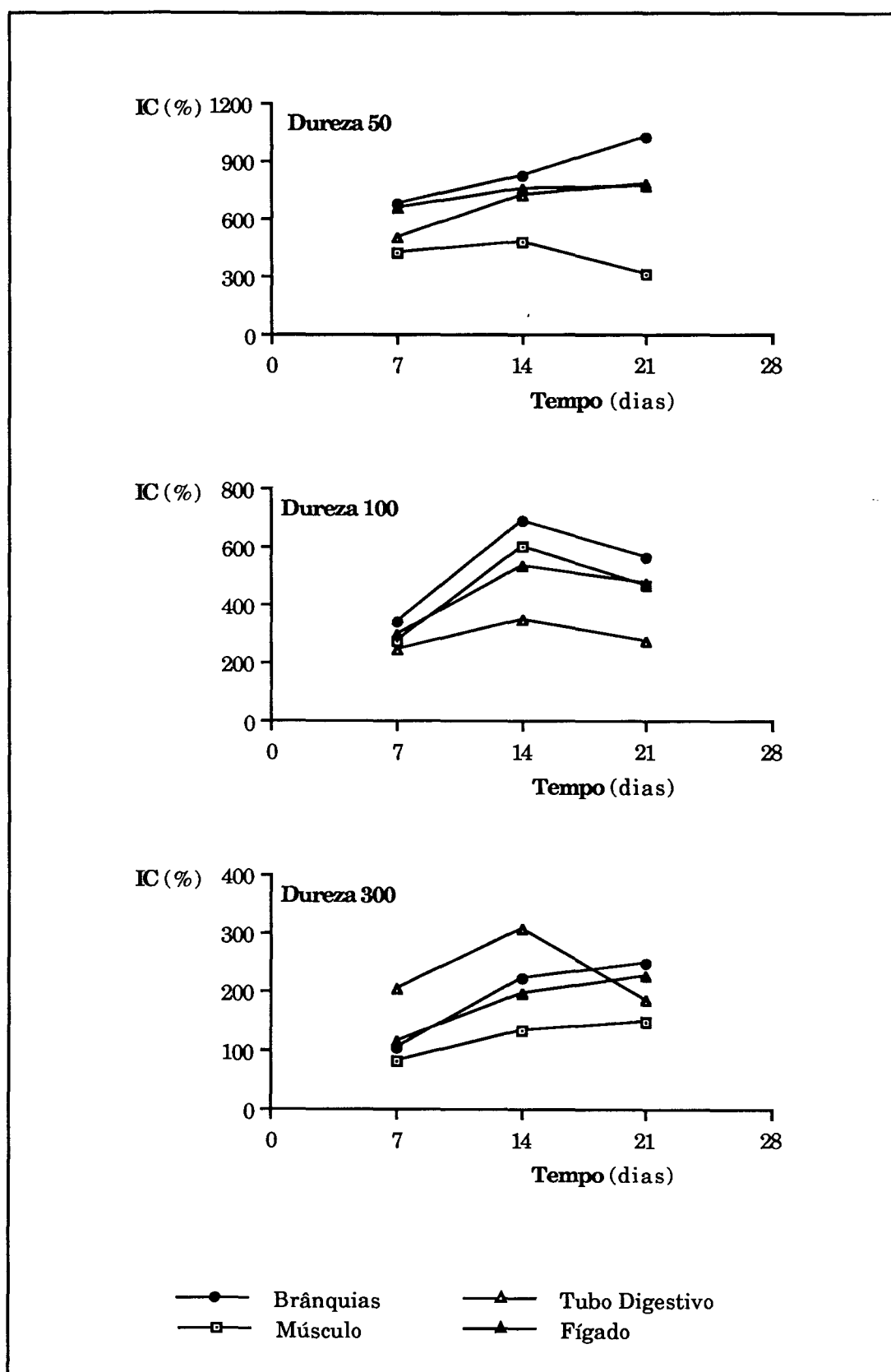


Figura 6.18 - Índices de Concentração (%) nos diferentes tecidos, para as três durezas de água testadas (50, 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃)

Os valores do factor de concentração, determinados na experiência 2 (Fase Experimental II) permitiram estimar as constantes de acumulação e de eliminação incluídas na equação proposta por John e col., (1987) para descrever a acumulação de metais em peixes

$$FC = \frac{CP}{CA} = \frac{K_w}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t})$$

FC - factor de concentração

CA, CP - concentração de cobre, respectivamente, na água e no peixe

K_w - constante de acumulação do metal

λ - constante de eliminação do metal

t - tempo de exposição

No cálculo efectuado, adoptou-se como factor de concentração, para os dias em que se realizaram determinações (0,7,14 e 21), o somatório dos factores correspondentes aos quatro órgãos estudados. Com efeito, sendo os factores de concentração aditivos, uma vez que a concentração na água era constante, este procedimento permite aproximar a metodologia utilizada por John (1987), que aplicou a equação considerando o cobre total existente em cada organismo, não o distinguindo por órgãos.

Na Tabela 6.29 resumem-se os valores estimados para as constantes da equação, os quais se obtiveram pelo método dos mínimos quadrados, através de um artifício de cálculo, isto é, reagrupando as constantes K_w e λ numa única.

Tabela 6.29 - Valores das constantes de acumulação e de eliminação da equação de John (1987)

Dureza (mg.l ⁻¹ CaCO ₃)	K_w (d ⁻¹)	λ (d ⁻¹)	T (d)
50	1083	0.035	19.8
100	570	0.025	27.7
300	243	0.024	28.8

Nesta tabela, para além do valor das constantes de acumulação e eliminação, apresentam-se também os valores da "vida média", (T), isto é, o tempo necessário para que a quantidade de poluente no peixe se reduza a metade, ($\lambda = \ln 2/T$) (John, 1987).

Muito embora os valores obtidos para as constantes tenham que ser encarados com a reserva correspondente à forma aproximada como foram obtidos, pode constatar-se uma variação indicativa da influência da dureza nos processos de bioacumulação de cobre em *Cyprinus carpio* L., confirmando-se a tendência observada nos resultados deste trabalho. Efectivamente, para o valor de dureza mais baixo, 50 mg.l⁻¹ CaCO₃, a acumulação é mais importante. Por outro lado, como se mostra na Figura 6.19, admite-se que em resultado da resposta fisiológica dos organismos ao cálcio e à sua interacção com o metal tóxico, a "vida média" aumenta com a dureza da água.

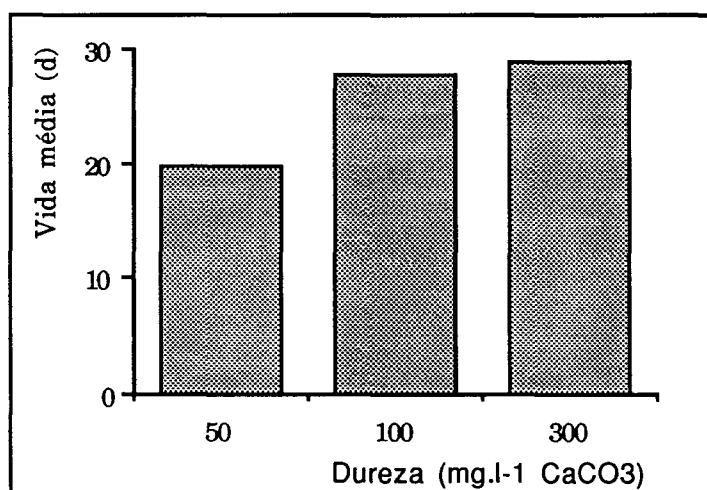


Figura 6.19 - Variação da "vida média" do metal com a dureza da água

A influência do valor de pH do meio foi também estudada, utilizando-se igualmente, durante uma semana, a dose de intoxicação de 0.2 da CL 50-48h. Como se pode observar pela Figura 6.20, embora se detectem algumas variações, considera-se que o efeito não é significativo para o período estudado. No entanto, é perceptível algum efeito para os

extremos do intervalo de valores de pH estudado, admitindo-se que estas concentrações mais elevadas resultem, no caso das brânquias, de um incremento de secreções de muco e consequentemente de precipitação de metal no tecido (Miller e Mackay, 1980). Por outro lado, se as concentrações mais elevadas, correspondentes ao valor de pH=5, se podem admitir como resultado da alteração do equilíbrio químico do cobre e da existência em solução de maior quantidade de cobre iônico livre, análise idêntica não é aplicável às concentrações relativas ao valor de pH=8.

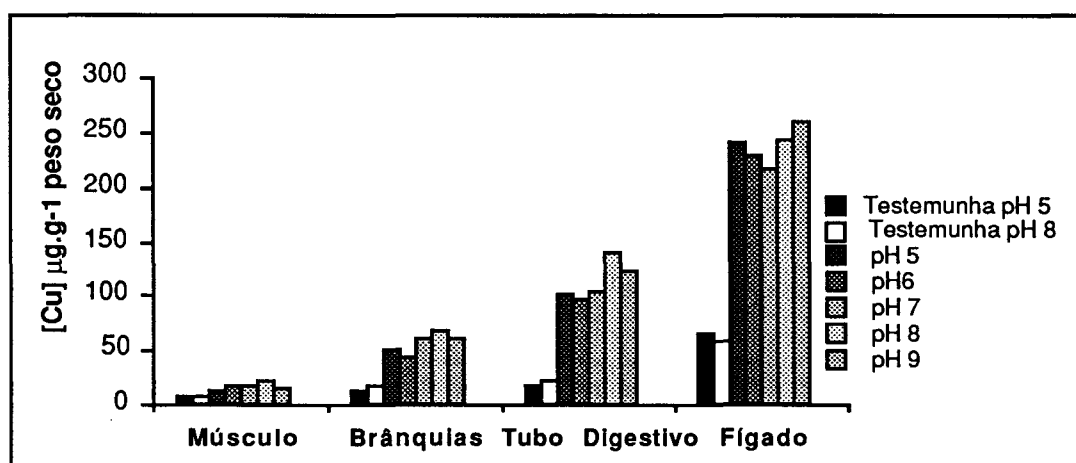


Figura 6.20 - Concentração de cobre nos diferentes órgãos dos indivíduos "testemunha" e dos indivíduos expostos a 0.2 da CL 50-48h, em função do pH, durante uma semana

Os resultados obtidos para a acumulação de cobre, adoptando-se uma dureza média de $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$, durante um período de quatro semanas, para diferentes níveis de intoxicação confirmaram, relativamente aos diferentes tecidos, a tendência verificada nas experiências precedentes, como se mostra nas Figuras 6.21 a 6.24. Como se pode observar, não foi possível obter valores para acumulação em períodos superiores a duas semanas, para as fracções de 0.3 e 0.4 da CL 50-48h, devido à mortalidade verificada. Constata-se assim a forte influência dos níveis de acumulação na sobrevivência do material biológico.

Efectivamente a mortalidade observada foi muito superior à que determina o valor da CL 50-48h, embora a concentração de tóxico fosse apenas de 30% do respectivo valor.

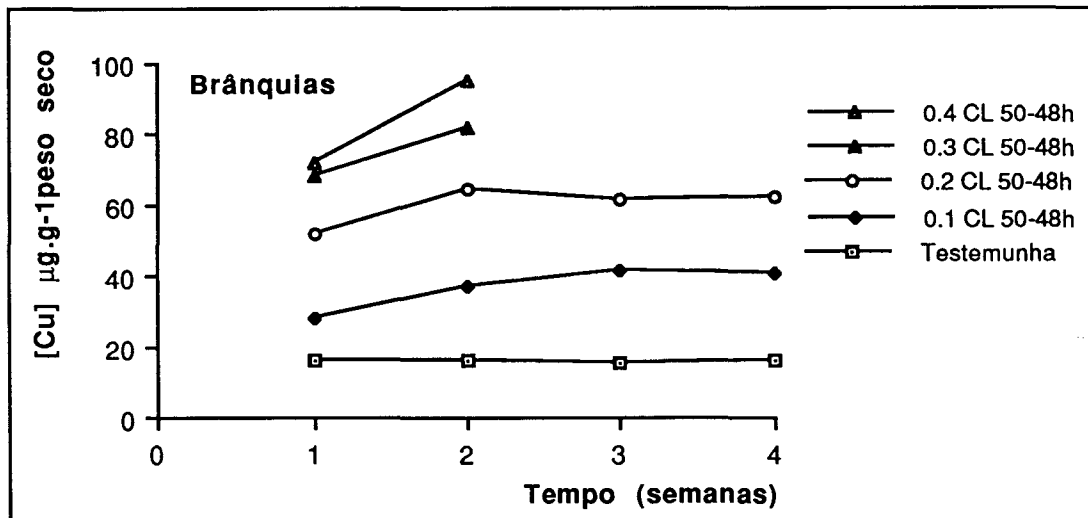


Figura 6.21 - Acumulação de cobre nas brânquias durante 4 semanas a diferentes frações da CL 50-48h

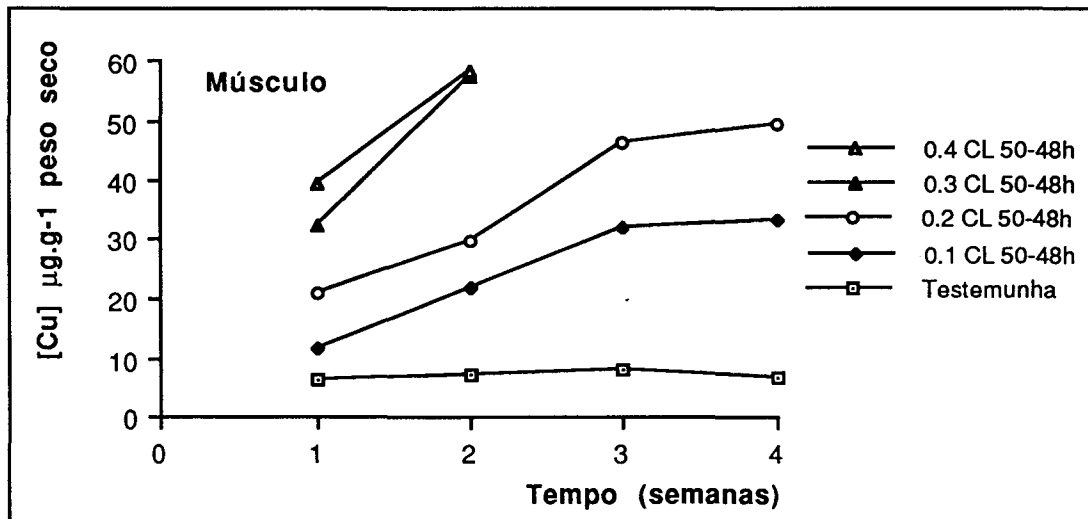


Figura 6.22 - Acumulação de cobre no músculo durante 4 semanas a diferentes frações da CL 50-48h

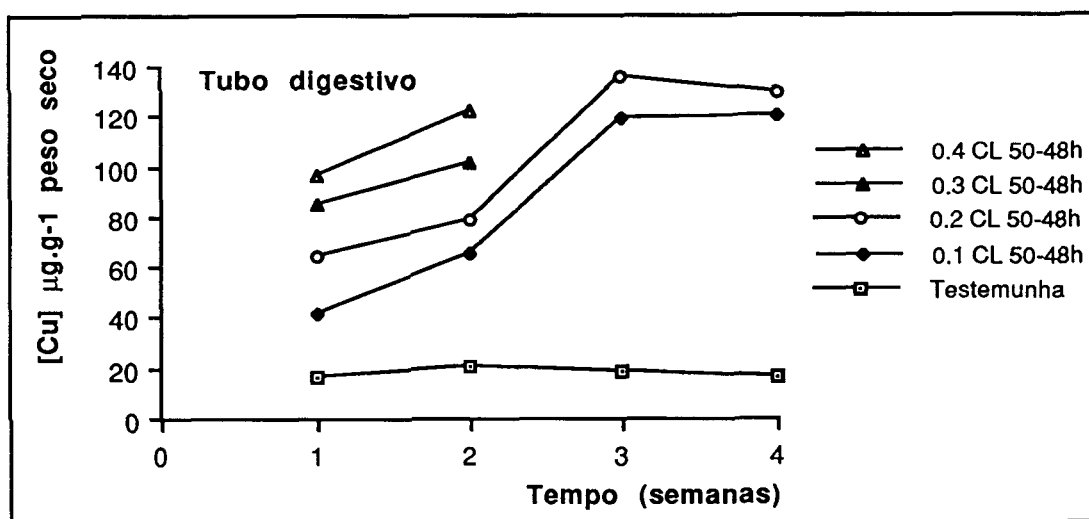


Figura 6.23 - Acumulação de cobre no tubo digestivo durante 4 semanas a diferentes frações da CL 50-48h

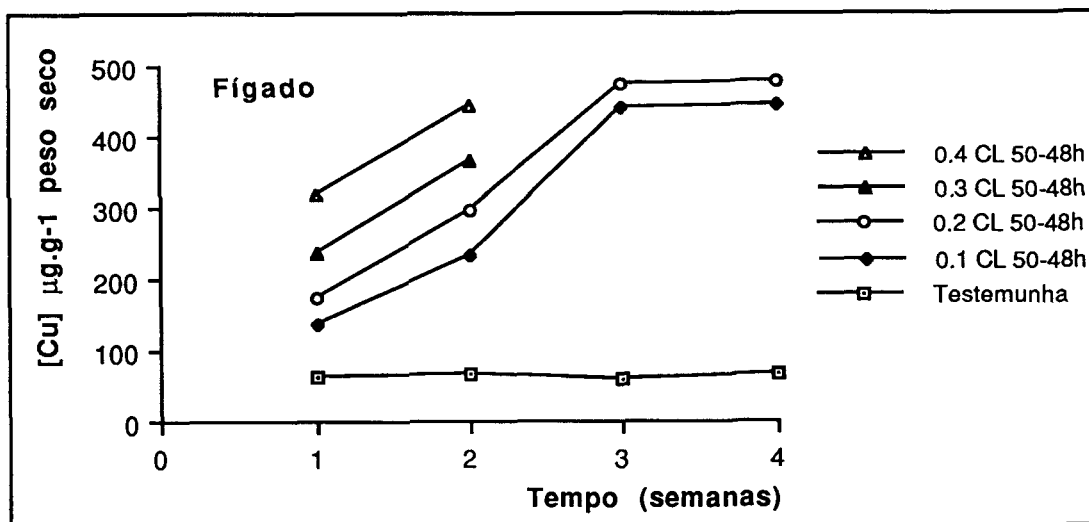


Figura 6.24 - Acumulação de cobre no fígado durante 4 semanas a diferentes frações da CL 50-48h

Nas Figuras 6.25 a 6.28, compara-se a evolução da concentração de cobre nos tecidos estudados para os quatro níveis de intoxicação utilizados.

Para os níveis em que se dispôs de valores, para o período de tempo total utilizado, pode observar-se que a taxa de acumulação mais importante se verifica durante a terceira semana, de forma semelhante aos resultados obtidos por Dixon e Sprague (1981), identificando-se um período inicial, em que o material biológico tem maior capacidade para resistir à intoxicação pelo cobre. Por outro lado, durante a quarta semana, observa-se praticamente uma estabilização da concentração de cobre, que se presume poder corresponder a uma fase em que a retenção de tóxico pelos organismos atinge um equilíbrio, quer por exaustão da sua capacidade de retenção, quer por funcionamento de mecanismos de eliminação de tóxico devido à síntese de metalotioninas (Cherian e Nordberg, 1983; McCarter e Roch, 1984). Muito embora para se poder compreender os efeitos da acumulação no material biológico fosse necessário prolongar significativamente os ensaios, por forma a permitir avaliar a sua sobrevivência, parece poder admitir-se, face aos resultados obtidos, que os resultados isolados da CL 50-48h, embora constituindo um indicador de toxicidade, tem uma representatividade discutível, relativamente à toxicidade de produtos presentes no meio.

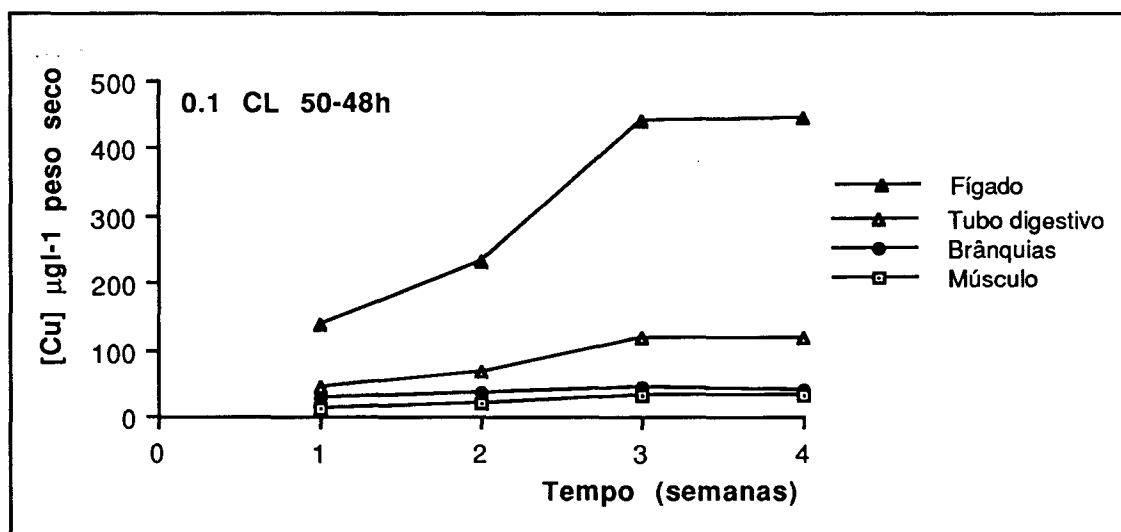


Figura 6.25 - Acumulação de cobre (0.1 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos

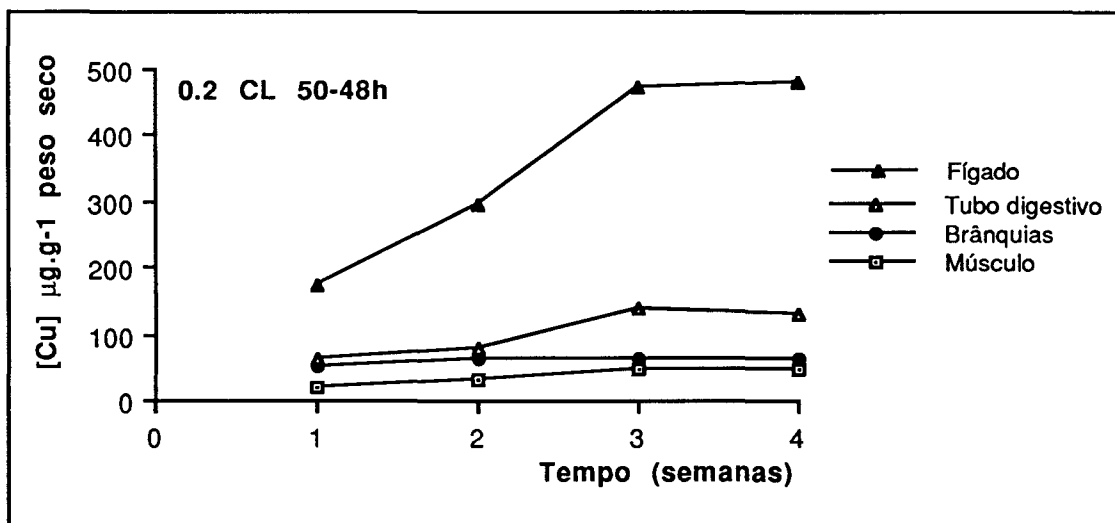


Figura 6.26 - Acumulação de cobre (0.2 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos

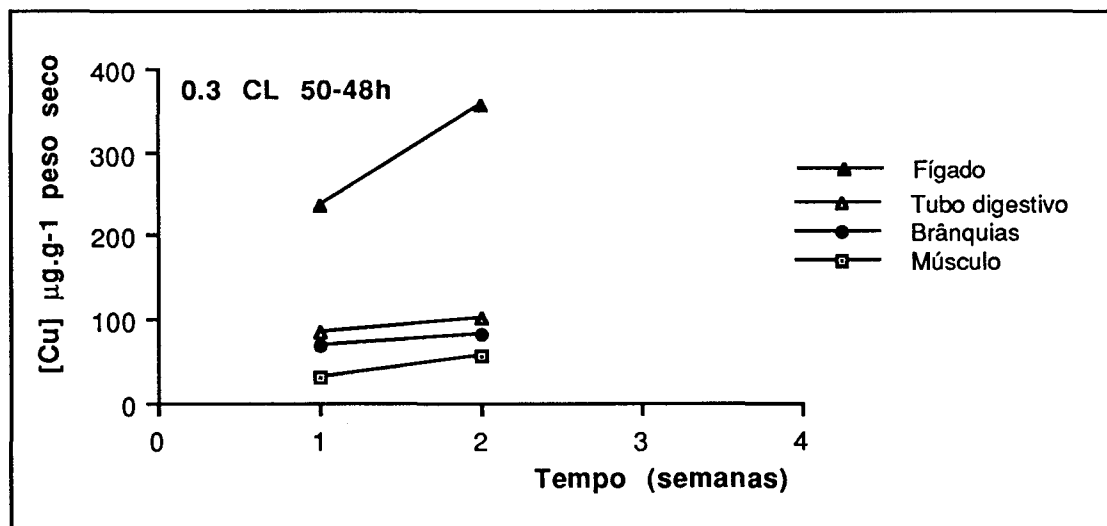


Figura 6.27 - Acumulação de cobre (0.3 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos

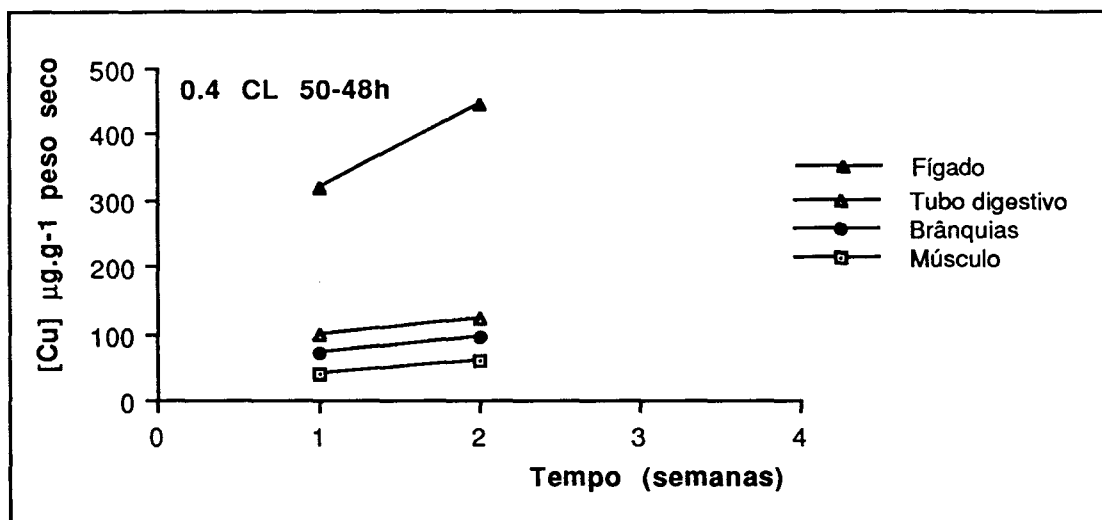


Figura 6.28 - Acumulação de cobre (0.4 CL 50-48h) durante 4 semanas nos diferentes tecidos

Os resultados obtidos nos ensaios de intoxicação gradual e crescente, mostram, relativamente à acumulação e concentração de cobre nos tecidos, uma matriz semelhante à dos ensaios a concentração constante, como se mostra na Figura 6.29. No entanto, com a intoxicação gradual, o material biológico suportou as doses de 0.3 e 0.4 da CL 50-48h, as quais, nas experiências anteriormente referidas tinham conduzido a uma mortalidade de 100%, a partir da segunda semana.

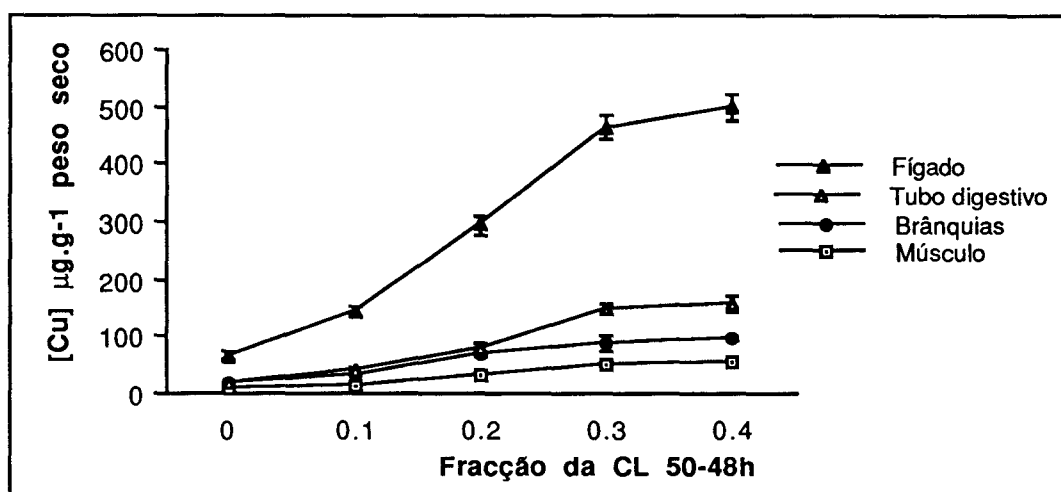


Figura 6.29 - Acumulação de cobre a fracções crescentes da CL 50-48h, durante 4 semanas nos diferentes órgãos

Os resultados descritos são portanto indicativos de que os organismos têm uma efectiva capacidade de adaptação, podendo aumentar os seus níveis de tolerância a produtos tóxicos quando previamente postos em contacto com aqueles produtos (Cherian e Nordberg, 1983). A referida capacidade parece estar relacionada com as metalotioninas formadas (Dixon e Sprague, 1981; Hamilton e Mehrle, 1986; Roch e col., 1986) isto é, a tolerância ao tóxico depende da oportunidade do organismo sintetizar aquelas proteínas, como resposta a uma dose que não produza efeitos patológicos.

Para o período de tempo em que foi possível obter valores de metal acumulado nos tecidos, isto é, para as duas primeiras semanas, calcularam-se os respectivos factores de concentração, que se comparam na Tabela 6.30. Pode observar-se que os valores dos factores de concentração ao fim da segunda semana de intoxicação gradual, são inferiores aos que se obtêm para a dose de intoxicação constante, o que poderá explicar as diferenças de sobrevivência verificadas neste tipo de ensaios.

Tabela 6.30 - Comparação da acumulação de cobre por intoxicação constante e gradual

TECIDOS	FACTOR DE CONCENTRAÇÃO			
	SEMANAS			
	1		2	
	(a)	(b)	(c)	(d)
Brânquias	1003	1171	1325	1235
Músculo	407	417	771	537
Tubo digestivo	1478	1542	2350	1417
Fígado	4953	5082	8300	5253

(a) e (c) - Factores de concentração obtidos ao fim da 1ª e 2ª semana - Experiência 3.1 e 3.2 da Fase Experimental III (Concentração Constante)

(b) e (d) - Factores de concentração obtidos ao fim da 1ª e 2ª semana - Experiência 3.5 da Fase Experimental III (Concentração Gradual)

6.3 Histologia, Histoquímica e Microanálise

6.3.1 Intoxicação aguda: CL 50-48h

6.3.1.1 Brânquias

Da observação dos cortes histológicos das brânquias de indivíduos expostos à CL 50-48h e a fracções desta (0.75, 0.5 e 0.4), numa água de dureza $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$, destacam-se os seguintes aspectos:

- significativa deterioração da estrutura branquial em qualquer dos casos, sendo já importante na exposição à fracção de 0.4 da CL 50-48h;
- nos organismos "testemunha" (Estampa I, Figura 1) as lamelas secundárias encontram-se espaçadas, apresentando no entanto, um espessamento do epitélio interlamelar do eixo. Este espessamento é frequentemente referido em peixes de cultura (Anderson e Mitchum, 1974). As células que segregam o muco são pouco numerosas (Estampa I, Figura 2);
- completo intumescimento do espaço interlamelar, descamações com necrose e um aumento do número de células secretoras de muco (Estampa I, Figura 3 e 5), relativamente aos indivíduos "testemunha" para a concentração de $280 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (CL 50-48h). Admite-se portanto que as trocas gasosas, entre a água e o sangue, deixem de se poder efectuar;
- lamelas secundárias progressivamente menos identificáveis e abundante secreção de muco (Estampa I, Figura 6 e 7; Estampa II, Figura 1 a 5), para as concentrações de $210 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (0.75 da CL 50-48h), $140 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (0.5 da CL 50-48h) e $112 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (0.4 da CL 50-48h). Saliente-se a dilatação da extremidade das lamelas secundárias, devido a trombose dos capilares branquiais para a concentração de 140 mg.l^{-1} (0.5 de CL 50-48h) (Estampa II, Figura 3).

A acção depletiva do cobre nas células de muco das brânquias da carpa foi assinalada por Labat e col. (1974) cujo trabalho mostra também que,

se o peixe sobrevive ao tóxico, existe um período em que se verifica uma ausência de células de muco, seguido de regeneração, logo que os peixes regressam às condições normais. No presente trabalho não foi possível efectuar esta observação visto que apenas incluía a fase de intoxicação.

Com base numa extensa revisão bibliográfica, sobre a acção dos metais a nível branquial, Pihan e Chrochard (1978) põem também em evidência o fenómeno da coalescência das lamelas, da secreção de muco e de modificações circulatórias, na presença de Zn, Cd, Hg, Pb, Ni, Co, Mn e Cu. Outros estudos, referem ainda perturbações da osmorregulação por alteração dos ionócitos bem como o aumento dos mastócitos.

As funções respiratória, excretora e secretora da brânquia poderão assim ser gravemente afectadas, ao mesmo tempo que se verifica a penetração de cobre no epitélio anormal intumescido. A reacção citoquímica ao ácido rubeânico (Estampa I, Figura 4) mostra que o cobre, presente no meio a uma concentração elevada, pode penetrar no interior dos tecidos, em 48 horas. Esta presença de cobre foi confirmada através de microanálise.

A mortalidade aguda pode portanto explicar-se por um edema generalizado com descolamento das células epiteliais e por necroses. Por outro lado, o intumescimento do espaço interlamelar é provocado por uma multiplicação celular, hiperplasia.

A camada de muco, como resposta ao "stress", constitui um obstáculo suplementar às trocas gasosas, podendo, segundo Roberts (1979), criar um meio favorável à proliferação de germes patogénicos. Na fase terminal verifica-se uma anorexia com hemorragia, provocando a morte.

- Microanálise

O espectro de cobre (Estampa III, Figura 1) caracteriza-se por dois picos: um a 63 e outro a 65, sendo este 44,7% do primeiro. Picos parasitas podem ser confundidos por associações tais como C_5H_3 a 63 e CaC_2H a 65, o que deve ser considerado na sua interpretação.

Assim, através de microanálise foi possível verificar o efeito do cobre pelo contraste entre indivíduos "testemunha" e indivíduos "expostos". Efectivamente, nos primeiros não se detecta cobre (Estampa III, Figura 2) em nenhum dos impactos "laser" no tecido branquial, enquanto que o contrário é observado nos indivíduos "expostos" com a proporção esperada entre isótopos.

6.3.1.2 Pele

A pele constitui a primeira barreira de protecção do organismo em relação ao meio ambiente, sendo portanto um órgão essencial para os processos de osmorregulação e de trocas gasosas (Roberts, 1979).

Nos indivíduos "testemunha" (Estampa IV, Figura 1 e 2) a pele apresenta as quatro camadas características. Observa-se um aumento de volume das células secretoras de muco, originárias das camadas médias, bem como uma aproximação da superfície, o que ocorre durante a fase de secreção (Estampa IV, Figura 1). Igualmente, são também observadas células arredondadas conhecidas por segregarem uma "substância de alarme" (Schreckstoffzellen) (Estampa IV, Figura 2).

Na presença de $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (CL 50-48h), pode observar-se o achatamento da epiderme, bem como o desaparecimento das células de muco (Estampa IV, Figura 3), surgindo núcleos picnóticos com início de necrose. A coloração citoquímica com ácido rubeânico põe em evidência uma nítida bioacumulação de cobre (Estampa IV, Figura 4).

Na presença de $210 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (0.75 da CL 50-48h) verifica-se que a cutícula foi destruída e que as células epidérmicas se descamam desordenadamente (Estampa V, Figura 2) podendo ainda observar-se que as células de muco aparecem a diferentes níveis da epiderme e não sómente à superfície (Estampa V, Figura 1).

Relativamente às concentrações de $140 \mu\text{g.l}^{-1}$ e de $112 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (respectivamente 0.5 e 0.4 da CL 50-48h) constata-se uma redução da espessura da epiderme (0.5 a 1/4 da espessura da epiderme dos

indivíduos "testemunha"), sendo raras as células de muco e não se observando células de "stress" (Estampa V, Figura 3 e 4).

As observações anteriores evidenciam a fragilidade da epiderme, podendo as suas alterações explicar a perda do poder osmorregulador.

- **Microanálise**

Apesar do contacto privilegiado da pele com o cobre em solução no meio, não foi detectado através da microanálise, nos cortes histológico, da pele, o que se admite ser consequência das descamações anteriormente referidas.

Embora as manifestações histopatológicas constatadas ao nível da pele da carpa sejam idênticas às descritas por Pequignot e col. (1975) para o alevim da truta, na presença de um sal de cobre, não foi possível esclarecer se se verificou regeneração de células de muco quando o organismo sobrevive, dado que os testes realizados não incluíam a fase de descontaminação. Alterações citológicas, necroses e aumento da produção de muco na fase de "stress" foram igualmente observadas na presença de Cd, Hg, Ni, Co e Mn (Pihan e Crochard, 1978).

6.3.1.3 Intestino

O estudo da parte média do intestino, permitiu efectuar as seguintes observações:

- em intoxicação aguda ($280 \mu\text{g.l}^{-1}$), os indivíduos apresentam um nítido aumento do número de células de muco (Estampa VI, Figura 2), assim como lesões das vilosidades intestinais (Estampa VI, Figura 3 e 4), relativamente aos indivíduos "testemunha" (Estampa VI, Figura 1);
- na presença de $210 \mu\text{g.l}^{-1}$ (0.75 da CL 50-48h) as células secretoras de muco penetram no canal intestinal (Estampa VII, Figura 1) ao mesmo tempo que as células digestivas do epitélio se encontram alteradas, por vezes com destruição do epitélio da "crista" da vilosidade (Estampa VII, Figura 2);

- para a concentração de $140 \mu\text{g.l}^{-1}$ (0.5 da CL 50-48h) é nítida a proliferação de células de muco (Estampa VI, Figura 3);
- na presença de $112 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (0.4 da CL 50-48h) observou-se um esvaziamento das células de muco dando origem a um cordão de muco no canal do tubo digestivo (Estampa VII, Figura 4). Neste caso o epitélio não apresenta células de muco, sendo menor a degenerescência das vilosidades.

Em comparação com dados bibliográficos sobre a truta (Pequignot e col., 1975), o cobre provoca na carpa uma modificação idêntica da secreção de muco da mucosa intestinal.

A hipótese de Pequignot e col. (1975) segundo a qual a depleção das células de muco da truta se verifica durante a exposição ao tóxico, na carpa parece observar-se para concentrações da ordem de 0.4 da CL 50-48h. O "stress" provocado pela presença de cobre provoca o esvaziamento das células de muco existentes, assim como a indução da sua síntese nas células ainda não activas. Este período de "stress" esgota as capacidades de produção de muco e, tal como anteriormente se referiu, a experiência realizada não foi prolongada por forma a permitir estudar a regeneração deste tipo de células. Manifestações idênticas da mucosa digestiva, na presença de Cd, Pb e Mn, foram observadas por Pihan e Chrochard (1978).

• Microanálise

Ao nível do tubo digestivo, via normal de passagem do meio ingerido, a detecção do cobre foi negativa com excepção de uma determinação, com a qual se obteve um espectro de difícil interpretação, detectando-se simultaneamente o cobre e outras associações, C_5H_3 (63) e $\text{Ca C}_2\text{H}$ (65) (Estampa VIII, Figura 1). A penetração de cobre através do canal alimentar parece provocar bioacumulação pelo epitélio, pelo menos a um nível compatível com os limites de detecção do LA.M.M.A. que é da ordem dos mg.l^{-1} .

As tentativas de pesquisa da localização de cobre em órgãos internos, como por exemplo o rim, não deram resultados positivos.

ESTAMPA I

Figura 1. Brânquia (indivíduo "testemunha")

Tricrômico de Masson

x 761

Lamelas secundárias das brânquias espaçadas (LS). Uma camada distinta de células epiteliais circunda uma vasta rede de capilares (seta). Espessamento do eixo do epitélio interlamelar.

Figura 2. Brânquia (indivíduo "testemunha")

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Células secretoras de muco pouco numerosas.

Figura 3. Brânquia (indivíduo contaminado - $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Tricrômico de Masson

x 761

Espaço interlamelar completamente colmatado. Descamações com necrose (N).

Figura 4. Brânquia (indivíduo contaminado - $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Ácido Rubeânico-Eosina

x 761

Localização histoquímica do cobre. Penetração do cobre no interior do tecido (seta).

Figura 5. Brânquia (indivíduo contaminado - $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Aumento do número de células secretoras de muco.

Figura 6. Brânquia (indivíduo contaminado - $210 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Tricrômico de Masson

x 761

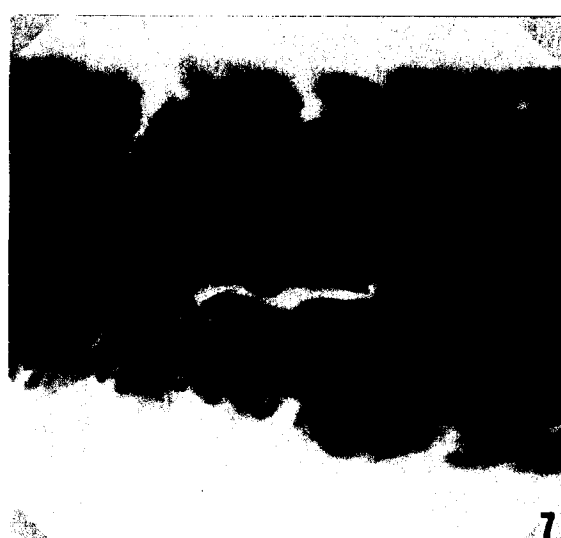
Lamelas secundárias menos identificáveis.

Figura 7. Brânquia (indivíduo contaminado - $210 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Secreção de muco abundante.



ESTAMPA II

Figura 1. Brânquia (indivíduo contaminado - $140 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)

Tricrômico de Masson

x 761

Hiperplasia (H).

Figura 2. Brânquia (indivíduo contaminado - $140 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Secreção abundante de muco (setas).

Figura 3. Brânquia (indivíduo contaminado - $140 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)

Tricrômico de Masson

x761

Dilatação da extremidade das lamelas secundárias devido a trombose dos capilares branquiais (T).

Figura 4. Brânquia (indivíduo contaminado - $112 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)

Tricrômico de Masson

x 761

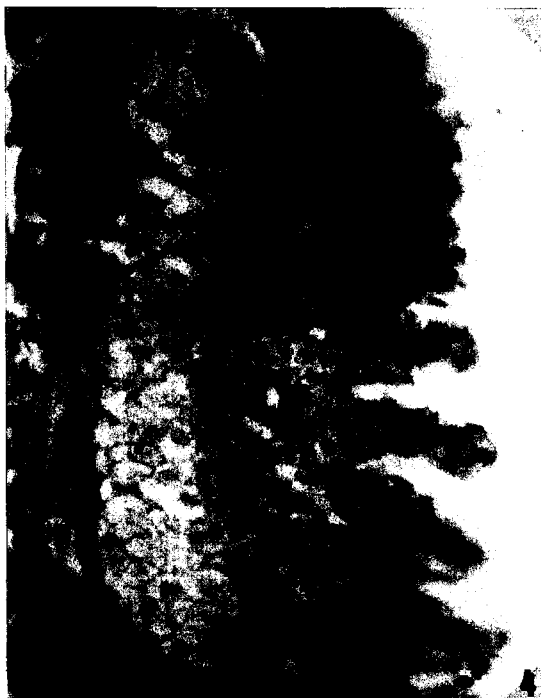
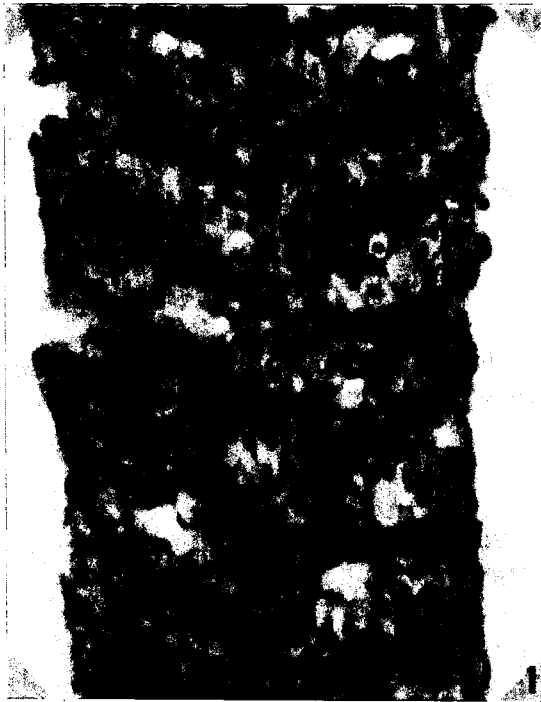
Hiperplasia já bem evidenciada.

Figura 5. Brânquia (indivíduo contaminado - $112 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Aumento das células secretoras de muco.

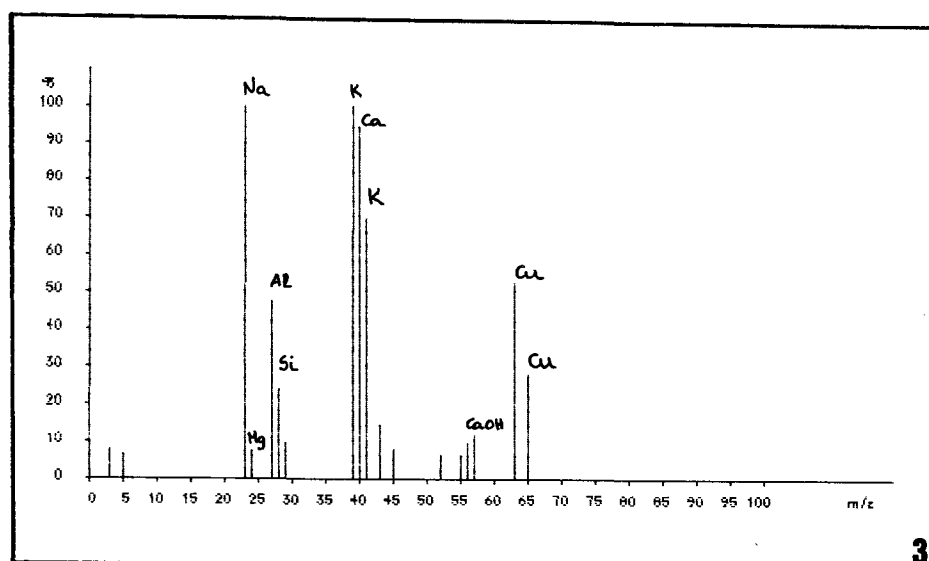
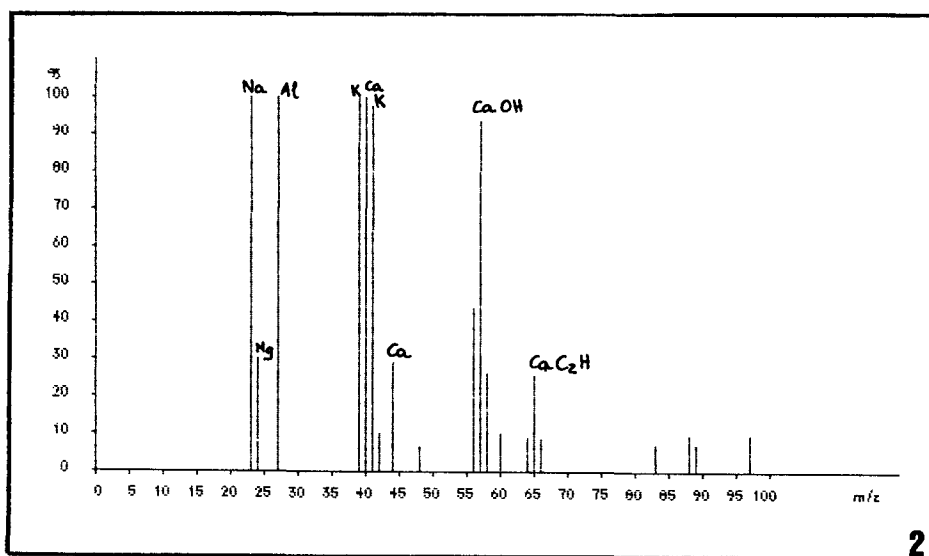
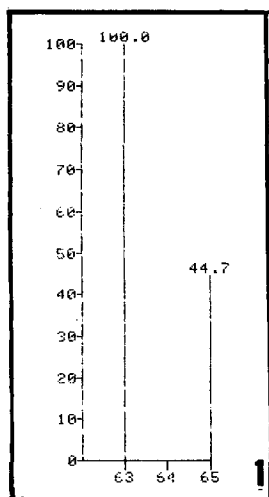


ESTAMPA III

Figura 1. Espectro de referência dos isótopos do cobre.

Figura 2. Espectro da brânquia de um indivíduo "testemunha": ausência de cobre (presença de CaC_2H no pico a 65 e ausência do pico a 63).

Figura 3. Espectro da brânquia de um indivíduo exposto a $300\ \mu\text{g.l}^{-1}\ \text{Cu}$ - 5 dias. Presença de cobre com os picos específicos a 63 e 65.



ESTAMPA IV

Figura 1. Pele (indivíduo "testemunha")

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Estrutura tegumentar normal com as quatro camadas características. Epiderme com uma espessura entre 30 a 50 μm . Células secretoras de muco (M).

Figura 2. Pele (indivíduo "testemunha")

Tricrómico de Masson

x 487

Estrutura normal do tegumento. Células arredondadas (Schreckstoffzellen) (S).

Figura 3. Pele (indivíduo contaminado - 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Achatamento da epiderme. Desaparecimento das células secretoras de muco. Núcleos picnóticos com início de necrose.

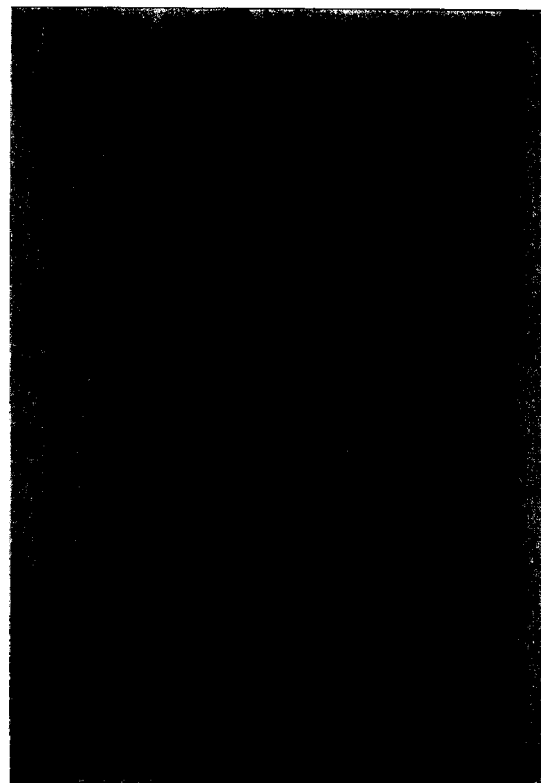
Figura 4. Pele (indivíduo contaminado - 280 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Ácido Rubeânico-Eosina

x761

Reacção citoquímica positiva no tecido destruído (seta).

ESTAMPA IV



ESTAMPA V

- Figura 1.** Pele (indivíduo contaminado - $210 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Destrução da cutícula. Células secretoras de muco a diferentes níveis da epiderme (M).
- Figura 2.** Pele (indivíduo contaminado - $210 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Tricrômico de Masson
x 487
Destrução geral.
- Figura 3.** Pele (indivíduo contaminado - $140 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Achatamento com algumas células secretoras de muco (M).
- Figura 4.** Pele (indivíduo contaminado - $112 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Lesão da pele. Redução da espessura da epiderme.

ESTAMPA V



ESTAMPA VI

Figura 1. Intestino (indivíduo "testemunha")

Azul de Alcian (Mowry)

x 192

Túnica muscular (TM) com uma camada interna circular e outra longitudinal. Bordadura nítida.

Figura 2. Intestino (indivíduo contaminado - $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Azul de Alcian (Mowry)

x 192

Aumento do número de células secretoras de muco (setas). Lesões das cristas das vilosidades (L).

Figura 3. Intestino (indivíduo contaminado - $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Detalhe de lesão da crista da vilosidade (L). Numerosas células secretoras de muco (seta).

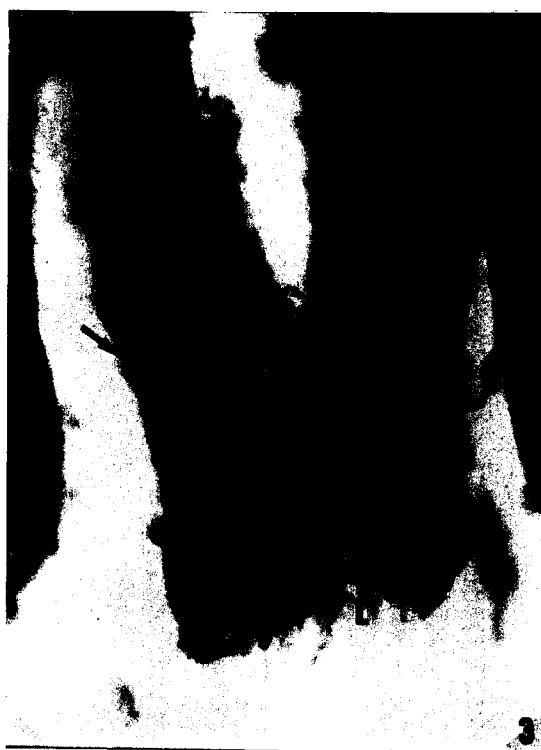
Figura 4. Intestino (indivíduo contaminado - $280 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu)

Tricrômico de Masson

x 761

Detalhe de lesão da vilosidade intestinal (L).

ESTAMPA VI



ESTAMPA VII

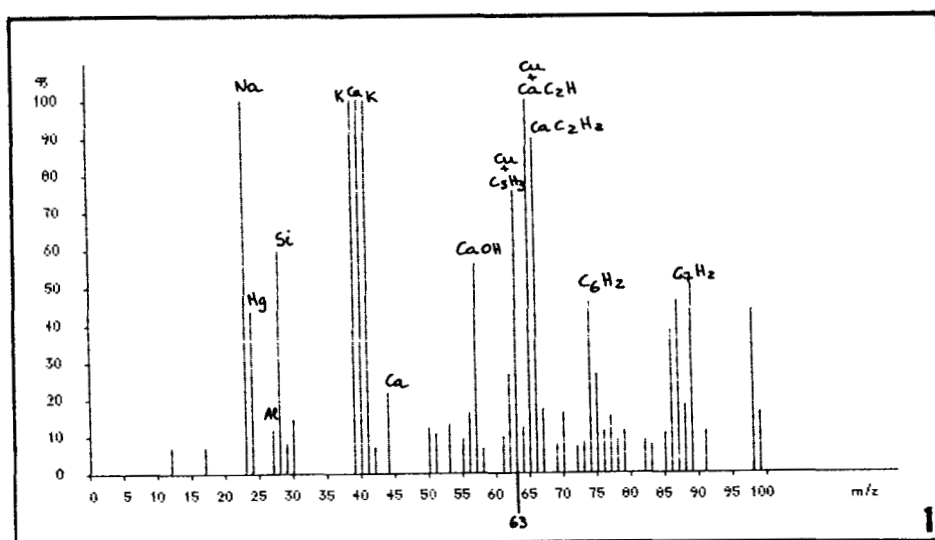
- Figura 1.** Intestino (indivíduo contaminado - $210 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Azul de Alcian (Mowry)
x 192
Células secretoras de muco penetrando no canal intestinal (M).
Início de lesões das cristas das vilosidades (L).
- Figura 2.** Intestino (indivíduo contaminado - $210 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Tricrômico de Masson
x 487
Detalhe da lesão (L).
- Figura 3.** Intestino (indivíduo contaminado - $140 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Azul de Alcian (Mowry)
x 192
Numerosas células secretoras de muco (M). Ausência de lesões.
- Figura 4.** Intestino (indivíduo contaminado - $112 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ Cu}$)
Azul de Alcian (Mowry)
x 192
Esvaziamento das células secretoras de muco, originando um
cordão de muco (CM) no canal do tubo digestivo.

ESTAMPA VII



ESTAMPA VIII

Figura 1. Espectro de um impacto laser ao nível do tubo digestivo (indivíduo exposto a $300 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cu}$ - 5 dias)



6.3.2 Intoxicação subletal (0.2 CL 50-48h)

6.3.2.1 Efeito da dureza nos diferentes órgãos

Dada a duração dos ensaios, e embora se tenha efectuado a observação de cortes histológicos ao longo do seu período de realização, apresentam-se apenas os resultados mais significativos, isto é os resultados observados no fim de cada ensaio.

6.3.2.1.1 Brânquias

Na Estampa I, (Figura 1 e 2) e Estampa IX, (Fig. 1 e 2) mostra-se a estrutura da brânquia dos indivíduos "testemunha" no início e ao fim de quatro semanas de experiência à dureza de 100 mg.l⁻¹ CaCO₃, respectivamente. A tendência do espessamento do epitélio basal interlamelar aumenta com o tempo sem no entanto deixar de permitir as trocas gasosas. Para as durezas da água de 50 e 100 mg.l⁻¹ CaCO₃ não se verificaram modificações notáveis da estrutura da brânquia nos indivíduos "testemunha" em relação às observadas anteriormente para a dureza de 100 mg. l⁻¹ CaCO₃.

Após três dias de exposição ao cobre e para todas as durezas da água estudadas, verifica-se um aumento imediato de secreção de muco. Após 8 dias de exposição a colmatação progride no espaço interlamelar, da base para a extremidade, onde se verifica, ao nível do epitélio, o respectivo descolamento e descamação.

Após 4 semanas de intoxicação, comparativamente com os indivíduos "testemunhas" (Estampa IX, Figura 1 e 2), a observação dos cortes histológicos dos indivíduos expostos, permite salientar os seguintes aspectos:

- diferente colmatação interlamelar (Estampa IX, Figura 3 e 5 e Estampa X, Figura 1) aumentando com a dureza e a concentração de cobre;
- descolamentos e descamações generalizados dos epitélios. Para a dureza de 300 mg. l⁻¹ CaCO₃ verifica-se uma trombose na extremidade das lamelas secundárias (Estampa X, Figura 1). A secreção de muco é muito reduzida nos indivíduos "testemunha" (Estampa IX, Figura 2) e

generalizada nos indivíduos expostos (Estampa IX, Figura 4 e 6; Estampa X, Figura 2);

- relativamente à hipótese de Labat e col. (1974) não se confirma a acção depletiva do cobre sobre as células de muco.
- a análise citoquímica é positiva, principalmente após 3 e 4 semanas de exposição à concentração máxima de cobre ($150 \mu\text{g.l}^{-1}$);
- ao fim de 3 semanas (Estampa X, Figura 3 e 4) a detecção ao ácido rubeânico é positiva ao nível das células periféricas, em contacto com o meio aquático, verificando-se ainda uma fraca reacção da cartilagem em algumas partes .

Ao fim de quatro semanas a detecção é positiva nos maciços celulares de colmatação (Estampa X, Figura 5) e nas ilhotas de "células de cloretos", normalmente situadas no epitélio de base interlamelar (Estampa X, Figura 6).

6.3.2.1.2 Pele

Para as durezas testadas, não se observam diferenças significativas nos indivíduos "testemunha". No entanto, para a dureza de $50 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$, verifica-se que a epiderme é mais espessa e que para a dureza de $300 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$, as células de muco são mais numerosas.

Como se pode observar pela Estampa XI (Figura 1 e 2), não se detecta cobre pelo método citoquímico.

Para a dureza de $50 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre, a destruição pode ser total até à derme esponjosa, a partir do terceiro dia de intoxicação, constatando-se ainda uma reacção dos capilares da hipoderme ao fim de uma semana, observando-se a sua regeneração parcial a partir da segunda semana. A partir da terceira semana há uma alternância de zonas regeneradas e de zonas ainda necrosadas, observando-se células de muco em número reduzido. Não se detectam "células de alarme" e esta situação mantem-se até à quarta semana (Estampa XI, Figura 3 e 5).

A coloração ao ácido rubeânico (citoquímica) é positiva localmente e à superfície (Estampa XI, Figura 4).

Para a dureza de $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e $55 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre a epiderme é nitidamente atingida desde o terceiro dia, apresentando necroses, sem desaparecer completamente.

Após uma semana observa-se descamação, necroses e alteração da estrutura da epiderme, estado que se mantém depois de duas semanas de exposição, embora a respectiva espessura se reduza a aproximadamente metade da que é verificada nos indivíduos "testemunha". Após três a quatro semanas pode constatar-se, segundo a região, quer uma restauração, com actividade exagerada das células de muco (Estampa XI, Figura 7), quer a persistência de necroses (Estampa XI, Figura 6).

Para a dureza de $300 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e $150 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre verifica-se um aumento do número e da actividade das células de muco desde o terceiro dia, modificando-se a camada superficial desde a primeira semana.

A descamação aumenta na segunda semana, sendo nítido o reaparecimento de células de muco, a partir da terceira semana (Estampa XII, Figura 3 e 4).

Na quarta semana há uma alternância de zonas ainda necrosadas (Estampa XII, Figura 1) e de zonas regeneradas, ricas em células de muco (Estampa XII, Figura 2), apresentando no entanto uma espessura menor que a epiderme dos indivíduos "testemunha" não se observando "células de alarme".

Como se pode observar (Estampa XII, Figura 5) verifica-se uma fixação do cobre à superfície da epiderme. No entanto a reacção é menor que a verificada para a dureza de $50 \text{ mg.l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ (Estampa XI, Figura 4).

Apesar dos teores em cobre representarem a mesma fracção da CL 50-48h (0.2) definida para cada dureza, os efeitos histopatológicos do cobre sobre a pele, não são uniformes. A capacidade de regeneração da epiderme é variável assim como a sua estrutura que pode ou não compreender células de muco.

Apenas na experiência com a dureza da água mais elevada, não se verificou uma acção do cobre muito desfavorável sobre a fisiologia geral do peixe. No entanto, observou-se um aumento da actividade das células de muco, com um dispêndio de energia ligado a esta actividade. As destruições observadas após uma semana, para a dureza de 100 mg.l⁻¹ CaCO₃ e após três e quatro semanas para a dureza de 50 mg.l⁻¹ CaCO₃, são consideradas graves, tanto mais que no meio natural poderiam ser a causa de patologias infecciosas adicionais.

Verifica-se uma regeneração de células de muco, na presença de intoxicação crónica de cobre, enquanto que Pequignot e col. (1975), não constata esta regeneração senão quando o peixe é reposto num meio natural (sem tóxico).

6.3.2.1.3 Intestino

O estudo diz respeito ao sector de intestino anteriormente referido, ou seja a sua parte média. As necroses da mucosa intestinal, observadas em intoxicação aguda (Estampa VI e Estampa VII), não se verificam em intoxicação crónica, na presença de 0.2 da CL 50-48h, para qualquer das dureza da água testadas. Mesmo após quatro semanas não se detectam manifestações patológicas (Estampa XIII, Figura 1 e 2).

A detecção citoquímica do cobre com o ácido rubeânico é positiva, quer para a dureza de 50 mg.l⁻¹ CaCO₃ (23 µg.l⁻¹ de Cu), quer para a de 100 mg.l⁻¹ CaCO₃ (55 µg.l⁻¹ de Cu). Verifica-se assim que há penetração do cobre na mucosa (Estampa XIII, Figura 3 e 4).

A reacção com a ditizona (Estampa XIII, Fig. 5 e 6) é mais forte, embora não seja conclusiva visto que não é específica do cobre, e que os precipitados de ditizonato podem também formar-se na presença de cobalto, manganês e mercúrio. No entanto, o intestino foi o único órgão que deu uma reacção positiva com a ditizona.

Assim, em intoxicação crónica, o intestino comporta-se principalmente como um órgão de bioacumulação, não sendo um órgão tão sensível à toxicidade do cobre, como a brânquia ou a pele.

6.3.2.1.4 Fígado

O fígado dos indivíduos "testemunha", depois de quatro semanas de experiência apresenta uma estrutura normal, (Estampa XIV, Figura 2 e 3), tendo no entanto uma menor densidade citoplasmática dos hepatocistos, relativamente ao início da experiência (Estampa XIV, Figura 1), o que se admite resultar da mudança de alimento, entre a piscicultura e o laboratório.

Após quatro semanas de intoxicação constata-se um aclaramento do parênquima hepático, na presença de $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (Estampa XIV, Figura 4). A reacção ao ácido rubeânico é positiva, localizando-se próximo das sinusóides, provavelmente células do sistema reticulo-endotelial (Estampa XIV, Figura 5). A deterioração acentua-se na presença de 55 e de $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (Estampa XV, Figura 1 a 4) e a cápsula fibrosa externa rodeia um parênquima hepático degenerado. O aspecto é esponjoso e as sinusóides venosas apresentam zonas de trombose.

À semelhança das observações de Baker (1969) e Pequignot e col. (1975), verifica-se uma degenerescência de gordura do tecido hepático, a qual é precedida por uma utilização do glicogénio hepático (Estampa XVI, Figura 1 a 3).

6.3.2.1.5 Rim

O rim dos indivíduos "testemunha" ao fim de quatro semanas, apresenta uma estrutura normal com as funções hematopoética e excretora (Estampa XVII, Figura 1).

Para a dose 50 e $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre o tecido hematopoético torna-se denso após quatro semanas (Estampa XVII, Figura 2, 3 e 4), enquanto que as células dos túbulos próximas apresentam uma vacuolarização (Estampa XVII, Figura 4) e o espaço de Bowman dos corpúsculos se apresenta dilatado (Estampa XVII, Figura 3).

Para as durezas 100 e sobretudo 300 mg.l⁻¹ CaCO₃ o tecido hematopoético é menos denso (Estampa XVIII, Figura 1 a 3) e os espaços de Bowman são dilatados.

A pesquisa de melanomacrófagos não mostra modificação significativa dos indivíduos expostos em relação aos "testemunha". Trata-se em todos os casos de indivíduos jovens, não tendo ainda desenvolvido o tecido de acumulação, embora se observe alguma actividade, especialmente nos indivíduos expostos a 23 µg.l⁻¹ de cobre (Dureza 50 mg.l⁻¹ CaCO₃) (Estampa XVIII, Figura 5).

A detecção do cobre ao ácido rubeânico é positiva, ao nível do tecido hematopoético e ao nível das células dos túbulos (Estampa XVIII, Figura 4).

A presença de cobre diminui a produção do tecido hematopoético do rim e perturba a função excretora dos túbulos (reabsorção de sais minerais) assim como a regulação osmótica.

6.3.2.1.6 Baço

O baço tem uma função hematopoética com duas estruturas: a polpa vermelha e a polpa branca, bem como uma função de destruição de células sanguíneas pela presença de macrófagos.

A polpa vermelha assinala-se pela densidade nuclear das células do sistema eritrocitário e a polpa branca pela presença das células do sistema leucocitário (Estampa XIX, Figura 1). O controlo da presença de cobre é negativo (Estampa XIX, Figura 2).

Para a dureza de 50 mg.l⁻¹ CaCO₃, após quatro semanas, a estrutura mantém-se com uma ligeira densidade da polpa vermelha (Estampa XIX, Figura 3). A detecção do cobre é muito positiva, comparativamente com os outros órgãos (Estampa XIX, Figura 4) e em relação aos indivíduos submetidos às durezas de 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃.

Para as durezas 100 e 300 mg.l⁻¹ CaCO₃, a polpa vermelha torna-se menos densa (Estampa XX, Figura 1 e 3) devido a anemia.

Os macrófagos não formam verdadeiros centros melanomacrofágicos, a detecção do cobre é positiva (Estampa XX, Figura 2 e 4), apresentando para a dureza 300 mg.l⁻¹ CaCO₃ uma concentração que assinala o princípio da formação dos referidos centros (Estampa XX, Figura 4).

Alterações histológicas do baço foram descritas, no caso de intoxicação pelo cobre no *Pseudopleuronectes* (Baker, 1969) e em *Cyprinus* (Pequignot e Moga, 1975), com o aparecimento de uma anemia por depressão do sistema eritrocitário e acumulação no sistema macrofágico da polpa branca.

6.3.3 Efeito do pH e do cobre sobre os diferentes órgãos

A variação do pH entre 5 e 9, em presença do cobre (0.2 da CL 50-48h a pH 8, isto é, 70 µg.l⁻¹) permite estudar as interações entre dois factores que intervêm negativamente na osmorregulação. Os órgãos mais expostos; brânquias, pele e intestino são objecto de um estudo específico. Contudo apresentam-se também os resultados mais significativos dos órgãos internos estudados: fígado, rim e baço.

Dos grupos de 10 indivíduos colocados em meios cujo pH variava entre 5 e 9 e com uma dureza de 100 mg.l⁻¹ CaCO₃, não houve mortalidade durante o período da experiência (oito dias); pelo contrário, a presença simultânea de pH 5 e 70 µg.l⁻¹ de cobre provocou 30% de mortalidade aos oito dias.

6.3.3.1 Brânquias

O estudo histológico realizado ao fim de oito dias tem como referência o estado da brânquia a pH 8 (Estampa XXI, Figura 1).

Para os valores de pH 5 e 6, observa-se uma abundante libertação de muco para o meio, independentemente da presença de cobre. O estudo histológico a pH 5, evidencia descamações e um processo de colmatação do espaço interlamelar (Estampa XXI, Figura 2). O número de células de muco é muito reduzido, o que se pode explicar por uma descarga total sob acção de "stress", sem possibilidade de regeneração posterior.

A pH 6, na ausência de cobre, a colmatação é importante (80%) (Estampa XXI, Figura 3) sendo total na presença do cobre (Estampa XXI, Figura 4). Observa-se um número reduzido de células de muco.

A pH 7, sem adição de cobre ao meio, o aspecto histológico é o de uma brânquia de indivíduos de cultura, apresentando uma ligeira colmatação interlamelar (Estampa XXI, Figura 5) e poucas células secretoras de muco. No entanto, na presença de cobre, observa-se um edema das lamelas secundárias, descamação e produção intensa de muco (Estampa XXI, Figura 6).

A pH 8, a brânquia apresenta uma estrutura de referência para um indivíduo de cultura (Estampa XXI, Figura 1 e Estampa XXI, Figura 1). Na presença simultânea de cobre, verifica-se uma colmatação e produção exagerada de muco (Estampa XXII, Figura 2).

A pH 9, a estrutura é normal (Estampa XXII, Figura 3 e 4), observando-se uma colmatação entre 50 e 90%, descamação e secreção de muco (Estampa XXII, Figura 5 e 6), quando em presença de cobre.

Verifica-se uma sinergia do pH e do cobre provocando uma alteração na osmorregulação do peixe. Para os valores de pH de 5 e 6 não se observa, ao fim de oito dias, a regeneração das células de muco, no entanto entre pH 7 e pH 9 há uma maior actividade da secreção ao mesmo tempo que uma perda da superfície de troca provoca uma anoxia mais ou menos grave.

6.3.3.2 Pele

O estudo específico da interacção pH/cobre na pele incidiu principalmente na secreção de muco.

Considera-se como estrutura de referência da pele a que se observa a pH 8, que é o pH da água de cultura. A este valor de pH (Estampa XXIV, Figura 1) observam-se poucas células de muco, no entanto, a

adição de cobre (0.2 da CL 50-48h) provoca uma importante secreção de muco (Estampa XXIV, Figura 2).

A pH 5, a espessura da epiderme é menor e o número de células de muco é reduzido (Estampa XXIII, Figura 1). Na presença simultânea de cobre, as células de muco cobrem a totalidade da epiderme (Estampa XXIII, Figura 2).

A pH 6, a epiderme está coberta com "células de alarme" e uma camada descontínua de células de muco (Estampa XXIII, Figura 3). Na presença simultânea de cobre observam-se necroses (Estampa XXIII, Figura 4) e edema da derme compacta.

A pH 7, a actividade das células de muco aumenta (Estampa XXIII, Figura 5) e na presença de cobre (Estampa XXIII, Figura 6) a pele apresenta-se recoberta por uma espessa camada de muco, englobando detritos celulares. A pH 9 a actividade secretora é importante (Estampa XXIV, Figura 3) e a presença simultânea de cobre não modifica significativamente este estado, embora seja menor a espessura da epiderme (Estampa XXIV, Figura 4).

Após uma semana de experiência a variação de pH 8 a pH 7, ou a pH 9 induz um aumento da actividade das células de muco. A presença simultânea de cobre apresenta quer o mesmo resultado (pH 9) quer provoca a secreção a pH 8 e sobretudo a pH 7.

A pH 6 e 5, o "stress" provoca o esvaziamento das células de muco, e a presença de cobre ou se verifica uma regeneração dessas células (pH 5) ou necrose da epiderme (pH 6).

A pele, órgão vital da osmorregulação no peixe (Roberts, 1979) é profundamente alterada pelas variações do pH e a presença de cobre tem efeito sinérgico.

6.3.3.3 Intestino

Deste órgão estudou-se apenas a parte média, tal como nas experiências anteriores.

Relativamente à estrutura de referência, considerada como a que se observa a pH 8, com as vilosidades bem desenvolvidas (Estampa XXV, Figura 1), células de muco regularmente repartidas (Estampa XXV, Figura 2) e um canal vazio, as alterações mais significativas são observadas a pH 5 e na presença simultânea de cobre. Com efeito, a pH 5, sem adição de cobre, não se observa senão um aumento da secreção de muco (Estampa XXV, Figura 3 e 4), enquanto que a pH 5 e na presença de $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cobre (0.2 da CL 50-48h), já se verifica uma alteração das vilosidades, bem como uma secreção abundante de muco e a presença, no canal, de tecidos necrosados envolvidos no muco (Estampa XXV, Figura 5 e 6).

Para os valores de pH 6, 7 e 9, com ou sem adição de cobre, assim como para pH 8 com adição de cobre, o estudo histológico não revela alterações. Em comparação com as brânquias e a pele, o intestino encontra-se protegido de uma acção directa e rápida do cobre, com excepção de quando há sinergia pH ácido/cobre.

6.3.3.4 Fígado

Relativamente à estrutura de referência considerada, a pH 8, sem adição de cobre (Estampa XIV, Figura 1 a 3), a variação do valor de pH do meio, por si só, não provoca modificações apreciáveis. No entanto, ao contrário, a associação da acidez com a presença de cobre determina uma degenerescência hepática, associada a pH 5, com uma trombose das sinusóides venosas (Estampa XXVI, Figura 1 e 2).

6.3.3.5 Rim

Relativamente à estrutura de referência, a pH 8 (Estampa XVII, Figura 1), a histologia na ausência do cobre a valores de pH 9, 7 e 6 é normal. A pH 5 observam-se algumas tromboses (Estampa XXVI, Figura 3). Na presença do cobre e para qualquer dos valores de pH estudados, observa-se uma alteração do tecido hematopoético, necroses nos corpúsculos de malpighi e descolamento das estruturas por edema (Estampa XXVI, Figura 4).

6.3.3.6 Baço

Para qualquer dos valores de pH estudados, na presença ou não de cobre, a estrutura do baço não apresenta modificações importantes. As "ilhas" da polpa branca estão bem individualizadas. A pH 5 e na presença de cobre, a polpa vermelha é no entanto dominante (Estampa XXVI, Figura. 5). Utilizando uma ampliação mais elevada, verifica-se que o sistema eritrocitário não fornece tantas formas maduras como nos indivíduos "testemunha" a pH 8 (anemia).

Dos três órgãos internos estudados (fígado, rim e baço), o fígado e o rim são os que apresentam alterações mais graves, com degenerescência. O período de oito dias não é suficiente para concluir acerca das capacidades de regeneração, que para valores de pH mais ácidos e na presença de cobre parecem bastante improváveis.

Parece existir uma significativa sinergia entre o pH do meio e baixas concentrações de cobre.

Interações deste tipo foram objecto de estudo de outros autores, como a seguir se indica:

- Miller e Mackay (1982) mostraram que na truta, a capacidade do muco complexar o cobre depende do pH;
- Massabuau (1985) cita, no caso de precipitações ácidas, uma interacção pH, concentração em Ca^{2+} , na presença de alumínio;
- Reid e McDonald (1988) estudaram os fluxos de Na^+ e Ca^{2+} na presença de cobre e para diferentes valores de pH. Apenas o fluxo de Na^+ era modificado, não havendo interacção do Ca^{2+} com o pH;
- Yong e Harvey (1989) mostraram um aumento de acumulação de Fe, Zn e Cu, em função da acidificação na espécie *Catostomus commersoni*, com, uma possibilidade de regulação pelo cobre.

ESTAMPA IX

Figura 1. Brânquia (indivíduo "testemunha")

Tricrômico de Masson

x 487

Aumento do espessamento do epitélio basal interlamelar (E).

Figura 2. Brânquia (indivíduo "testemunha")

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Aumento do espessamento do epitélio basal interlamelar (E).

Ausência de células secretoras de muco. "Células de cloretos" (C).

Figura 3. Brânquia (indivíduo contaminado-23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 487

Hemorragia (H). Trombose (T).

Figura 4. Brânquia (indivíduo contaminado-23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Células secretoras de muco (M).

Figura 5. Brânquia (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 487

Espessamento das lamelas secundárias (seta).

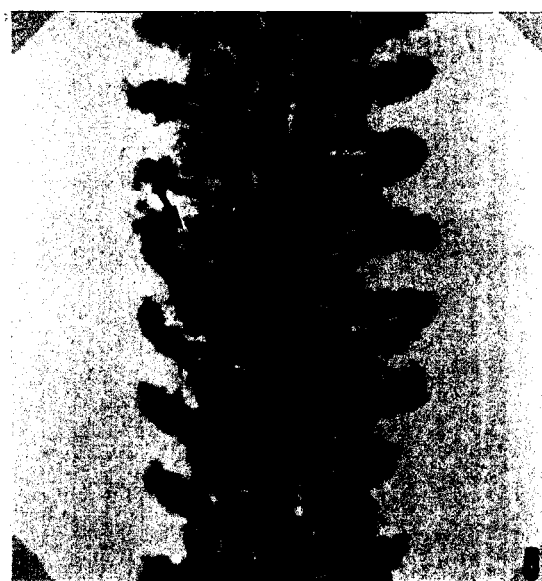
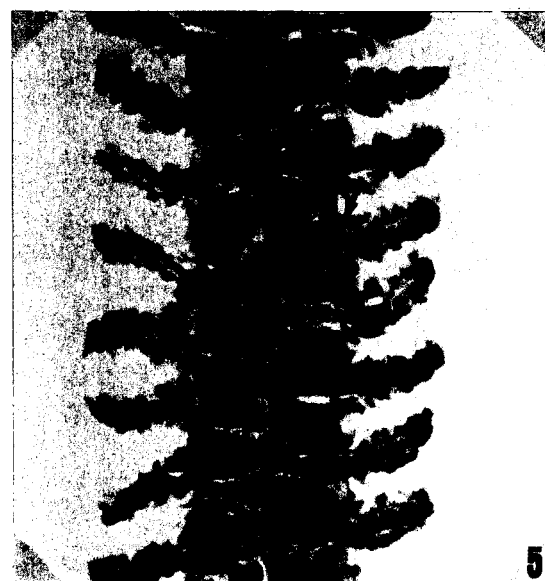
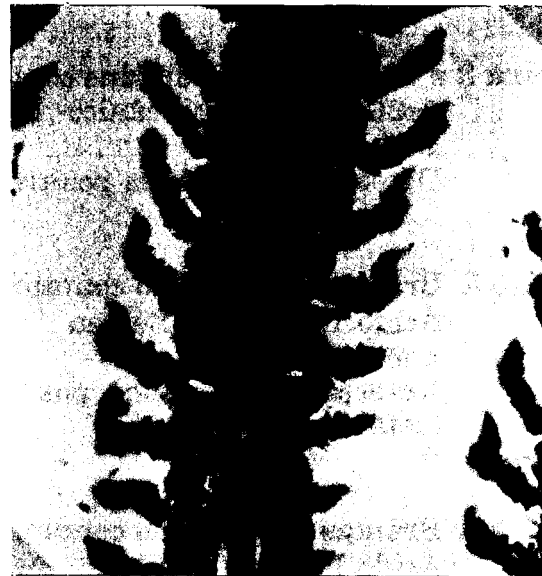
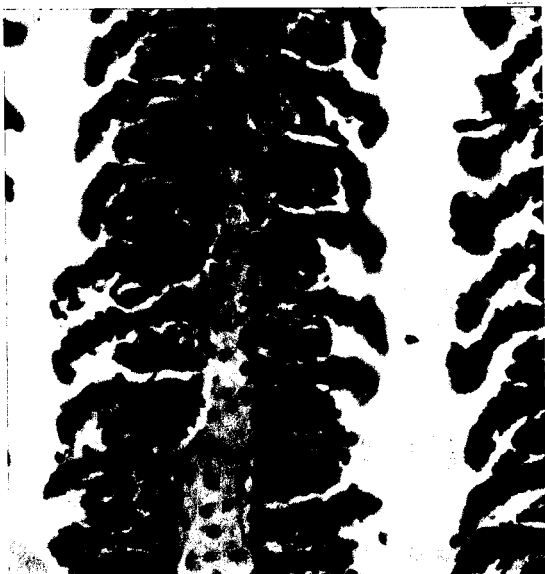
Figura 6. Brânquia (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Espessamento das lamelas secundárias (E). Numerosas células secretoras de muco (seta).

ESTAMPA IX



ESTAMPA X

Figura 1. Brânquia (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson

x 487

Espessamento das lamelas secundárias com trombose dos capilares branquiais (T). Colmatação do espaço interlamelar. Descamação dos epitélios (seta).

Figura 2. Brânquia (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza =300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Colmatação do espaço interlamelar. Numerosas células secretoras de muco (M).

Figura 3 e 4. Brânquia (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza = 300 mg.l^{-1} CaCO_3). Ácido Rubeânico- Eosina

x 487

Detecção citoquímica positiva ao nível das células periféricas (seta).

Figura 5. Brânquia (indivíduo contaminado - 23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico-Eosina

x 761

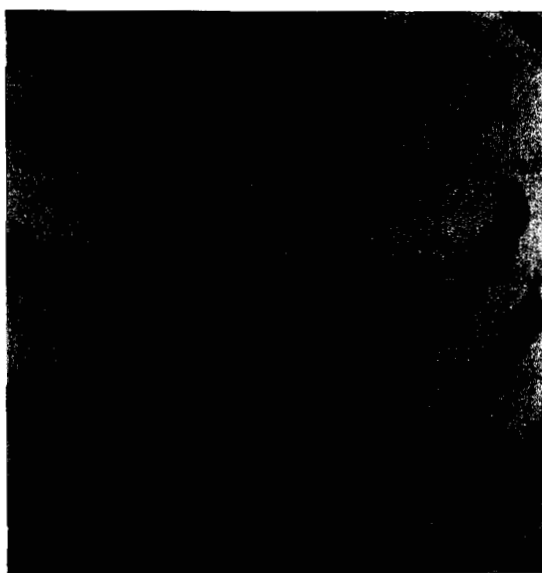
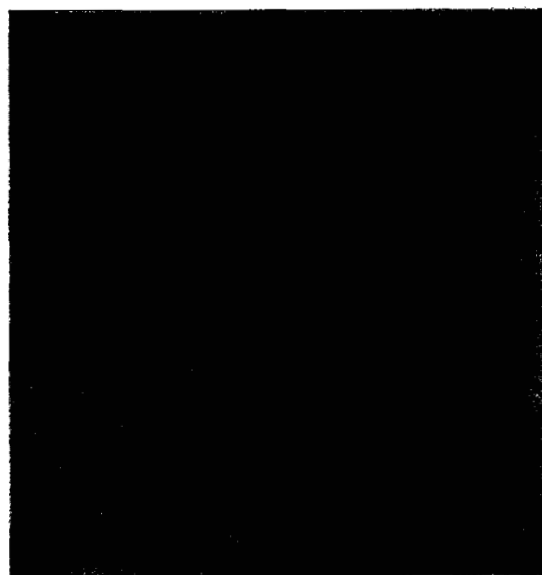
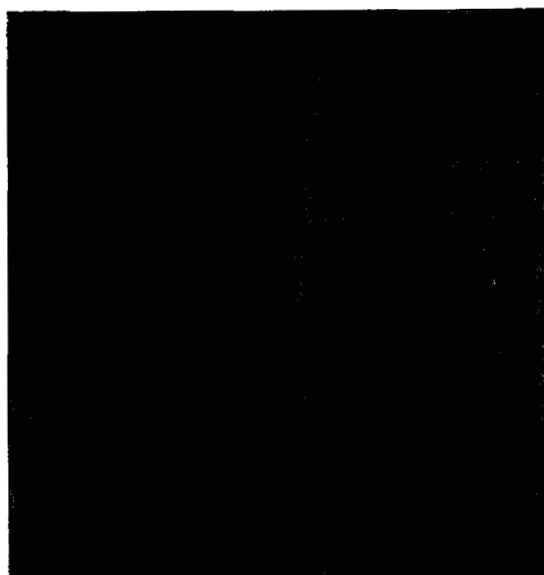
Detecção citoquímica positiva nos maciços celulares de colmatação (seta).

Figura 6. Brânquia (indivíduo contaminado - 23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico- Eosina

x 761

Detecção citoquímica positiva nas ilhotas de "células de cloretos" (seta).

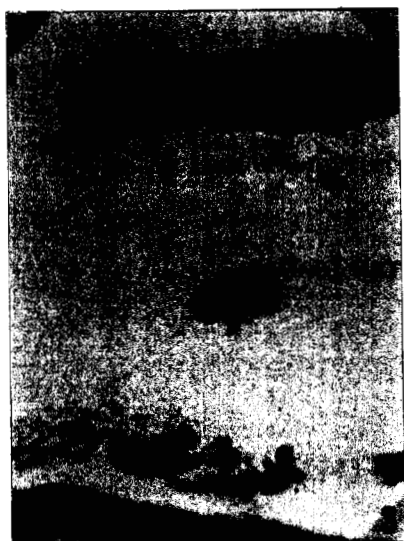
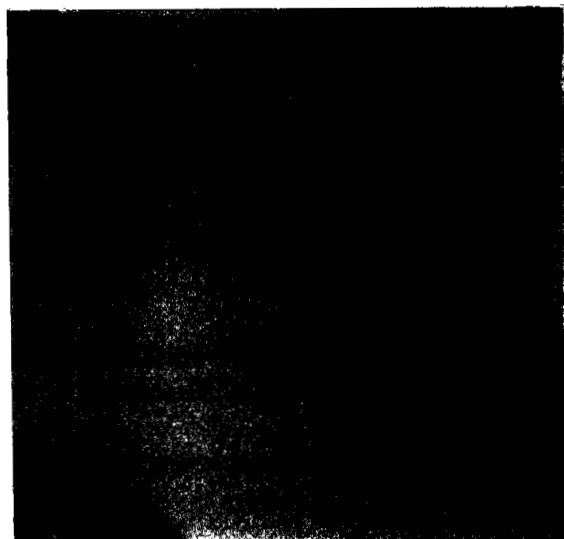
ESTAMPA X



ESTAMPA XI

- Figura 1.** Pele (indivíduo "testemunha")
Tricrômico de Masson
x 761
Estrutura tegumentar normal. Células arredondadas (Schreckstoffzellen)(S).
- Figura 2.** Pele (indivíduo "testemunha")
Ácido Rubeânico-Eosina
x 487
Detecção citoquímica do cobre negativa.
- Figura 3.** Pele (indivíduo contaminado - $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 761
Descolamento da epiderme. Hemorragia.
- Figura 4.** Pele (indivíduo contaminado - $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico- Eosina
x 761
Localização do cobre à superfície da epiderme (seta).
- Figura 5.** Pele (indivíduo contaminado - $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Raras células de muco. Ausência de " células de alarme". (Schreckstoffzellen)
- Figura 6.** Pele (indivíduo contaminado - $55 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 761
Descamação, necroses e alteração da estrutura da epiderme.
- Figura 7.** Pele (indivíduo contaminado - $55 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Aumento das células secretoras de muco (M).

ESTAMPA XI



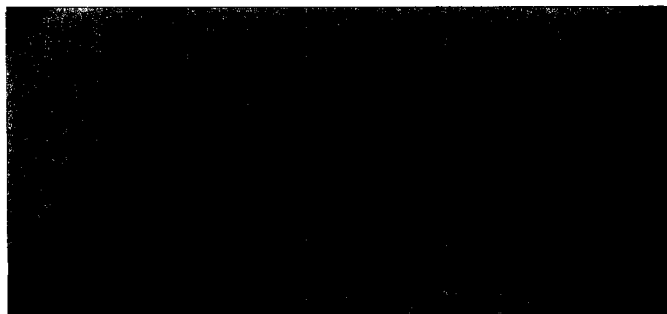
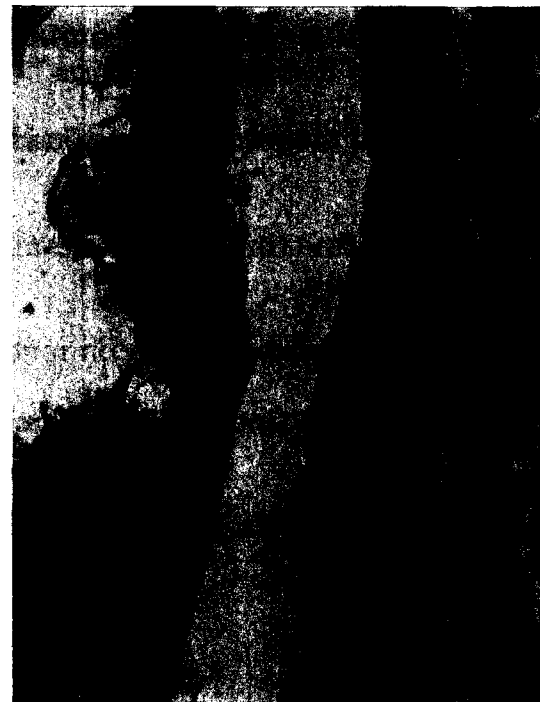
ESTAMPA XII

Figura 1. Pele (indivíduo contaminado - $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 487
Zonas da epiderme com necroses (setas).

Figura 2. Pele (indivíduo contaminado - $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 487
Zonas da epiderme regeneradas (setas).

Figura 3 e 4. Pele (indivíduo contaminado- $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza = 300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Aumento das células secretoras de muco (M).

Figura 5. Pele (indivíduo contaminado - $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico- Eosina
x 761
Localização do cobre à superfície da epiderme (seta).



ESTAMPA XIII

Figura 1. Intestino ((indivíduo contaminado-23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson

x 487

Bordadura nítida. Túnica muscular (TM). Estrato compacto (EC).

Figura 2. Intestino ((indivíduo contaminado -55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson

x 487

Aspecto semelhante ao do indivíduo da figura anterior.

Figura 3. Intestino (indivíduo contaminado-23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico- Eosina

x 487

Penetração do cobre na mucosa (setas).

Figura 4. Intestino ((indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico- Eosina

x 761

Corte tangente a uma vilosidade. Penetração do cobre na mucosa (seta).

Figura 5. Intestino (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza = 100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ditizona

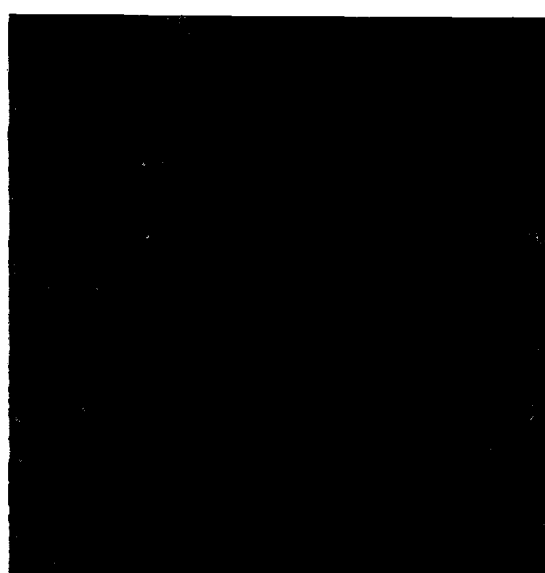
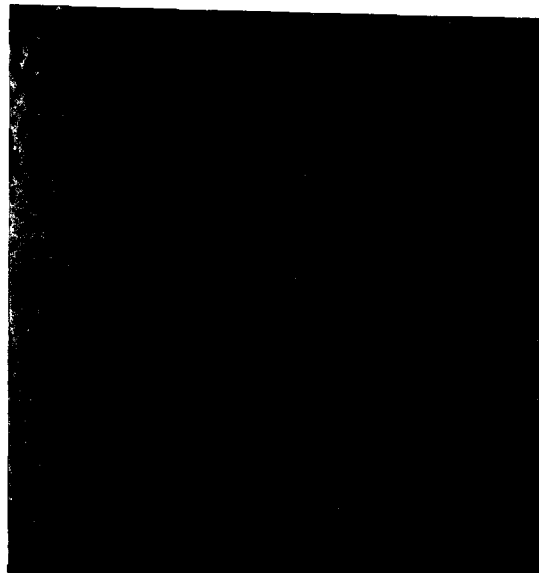
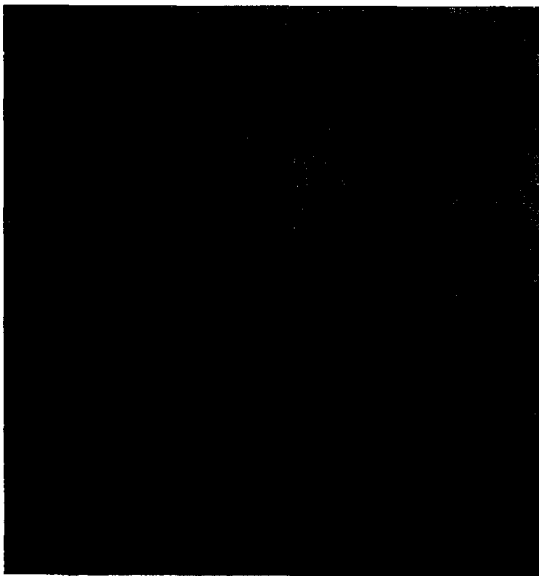
x 761

Penetração do cobre na mucosa (seta).

Figura 6. Intestino (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza = 100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ditizona

x 3043

Pormenor da localização do cobre na mucosa (seta).



ESTAMPA XIV

Figura 1. Fígado (indivíduo "testemunha")

Tricrômio de Masson

x 487

Grande densidade citoplasmática dos hepatocistos (H) no início da experiência (dia zero). Sinusoides (S) contendo eritrócitos.

Figura 2. Fígado (indivíduo "testemunha")

Tricrômico de Masson

x 761

Parênquima hepático. Diminuição da densidade citoplasmática no final da experiência

Figura 3. Fígado (indivíduo "testemunha")

Tricrômico de Masson

x 761

Veia hepática (VH).

Figura 4. Fígado (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 487

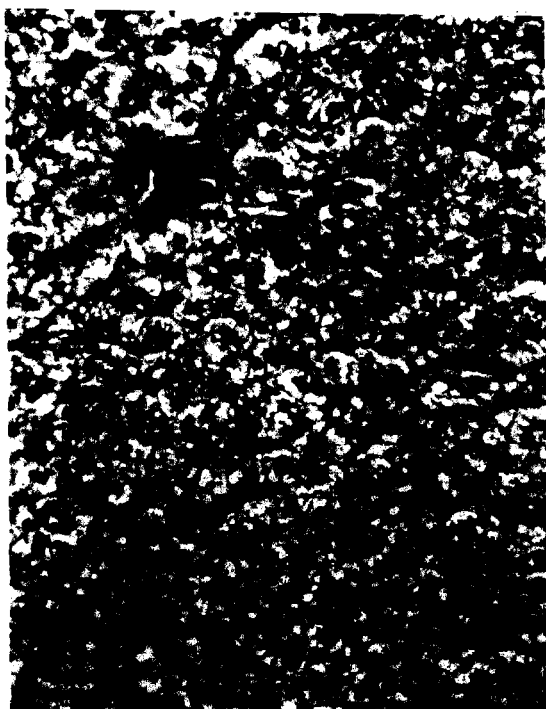
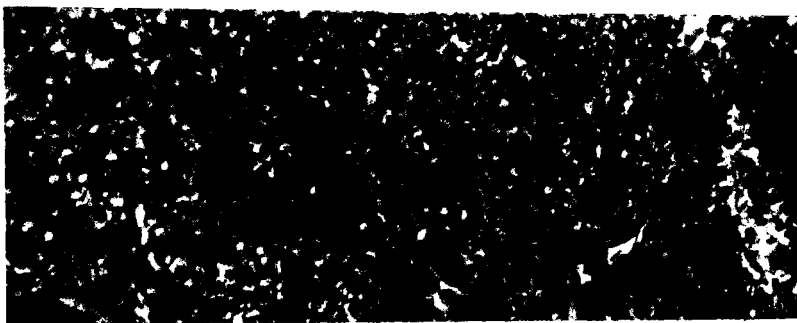
Aclaramento do parênquima hepático. Sinusoides (S).

Figura 5. Fígado (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Ácido Rubeânico- Eosina

x 761

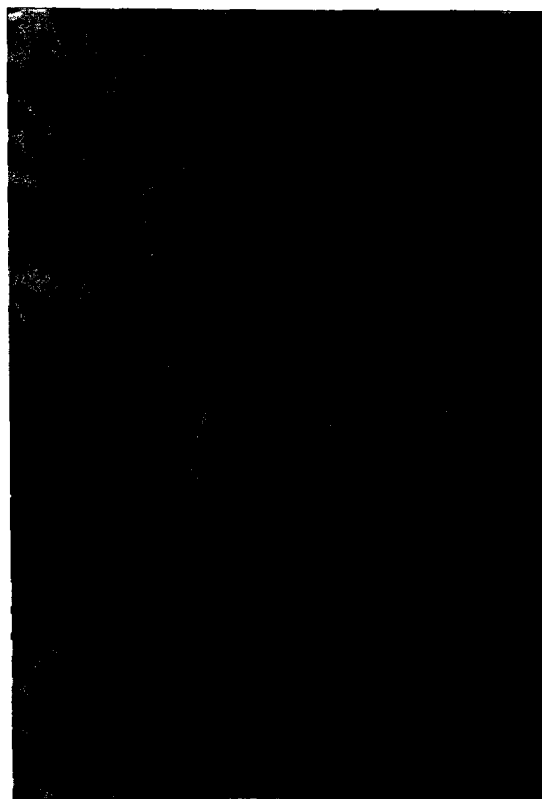
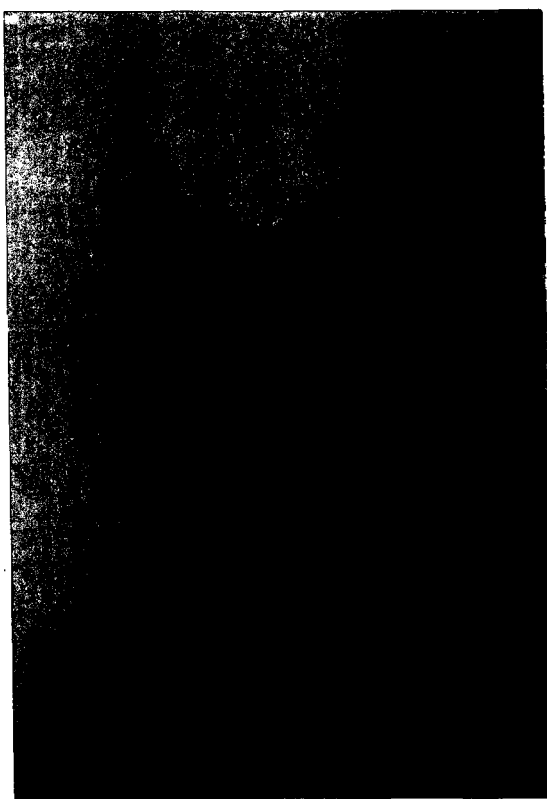
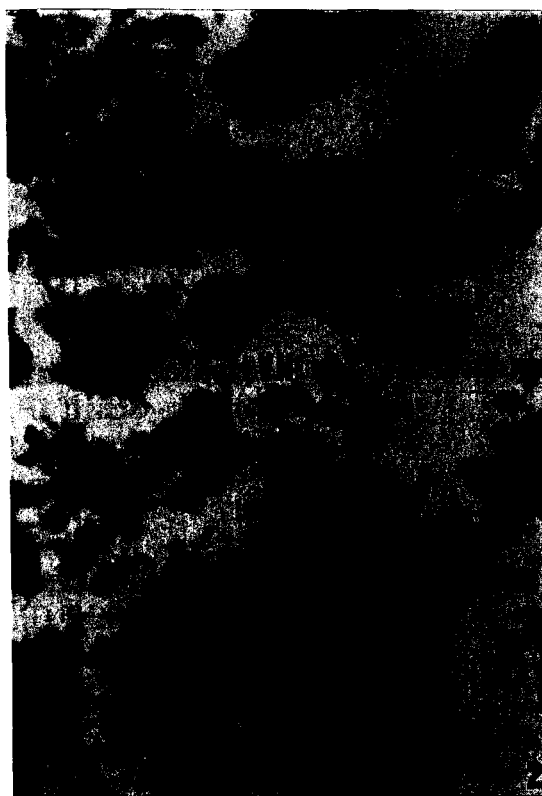
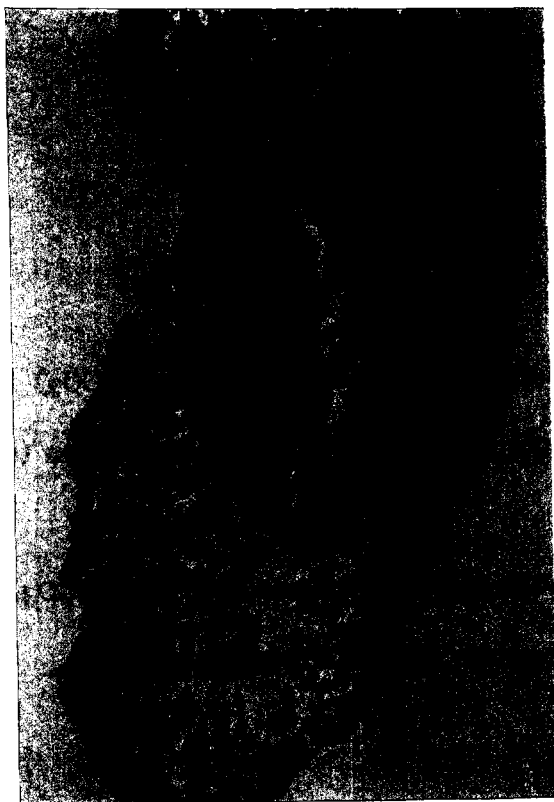
Localização do cobre próximo das sinusoides (setas).



ESTAMPA XV

- Figura 1.** Fígado (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 192
Destruição do parênquima hepático (seta). Trombose das sinusoides venosas (T).
- Figura 2.** Fígado (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x761
Destruição do parênquima hepático. Veia hepática (VH).
- Figura 3.** Fígado (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 192
Parênquima hepático degenerado. Trombose das sinusoides venosas (T).
- Figura 4.** Fígado (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Tricrômico de Masson
x 761
Destruição e aclaramento do parênquima hepático.

ESTAMPA XV



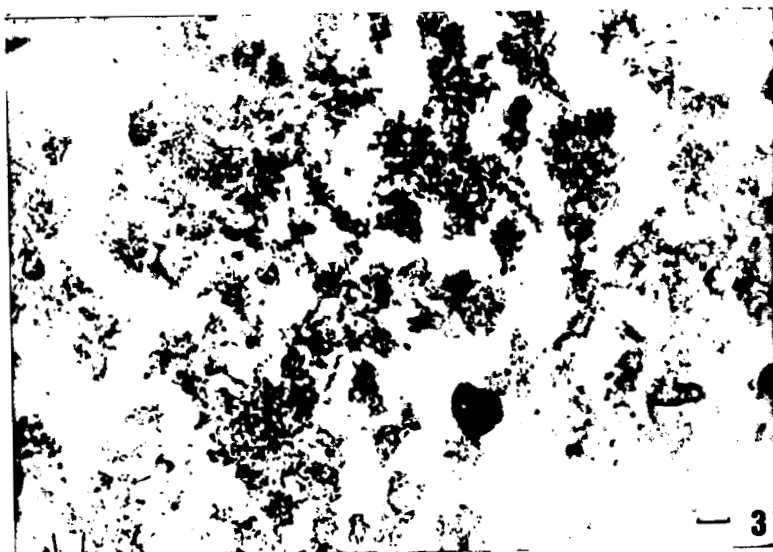
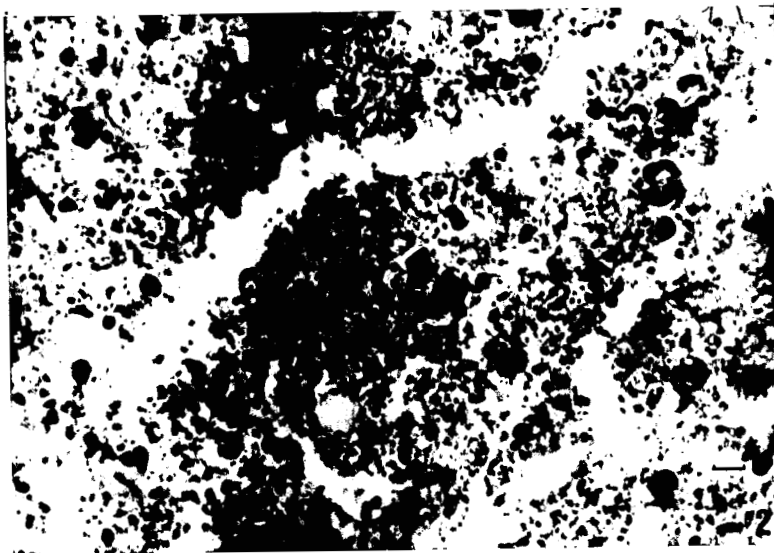
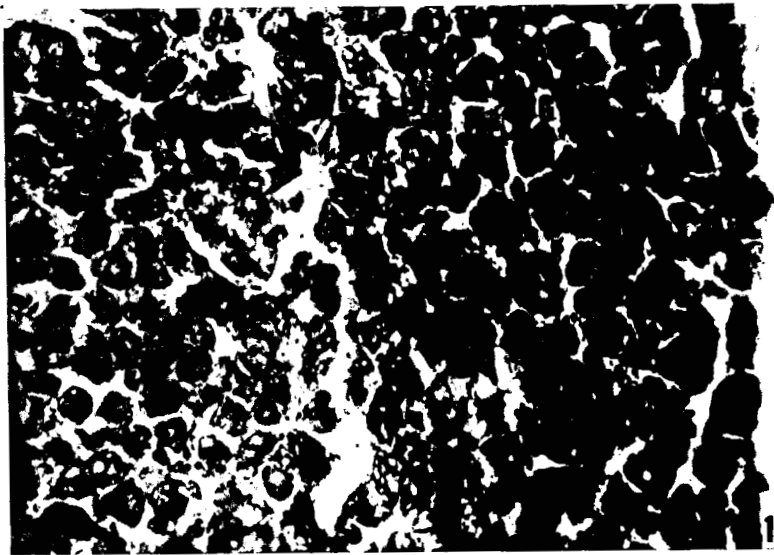
ESTAMPA XVI

Figura 1. Fígado (indivíduo "testemunha")
Ácido periódico - Schiff (P.A.S)
Glicogénio abundante (G).

Figura 2. Fígado (indivíduo contaminado- $55 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido periódico - Schiff (P.A.S.)
Diminuição do glicogénio em relação ao indivíduo "testemunha"(G).

Figura 3. Fígado (indivíduo contaminado- $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido periódico - Schiff (P.A.S.)
Degenerescência hepática. Glicogénio pouco abundante (G).

•A barra representa $10 \mu\text{m}$.



ESTAMPA XVII

Figura 1. Rim (indivíduo "testemunha")

Tricrômico de Masson

x 761

Estrutura normal. Corpúsculo renal (seta) constituído pelos glomérulos (GL) e pela cápsula de "Bowman"(B). Cortes transversais dos túbulos (TU), em U.

Figura 2. Rim (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 761

Secção do tubo em U. Tecido hematopoiético mais denso (TH).

Figura 3. Rim (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 1217

Tecido hematopoético mais denso (TH). Corpúsculo, com o espaço de "Bowman" dilatado (seta).

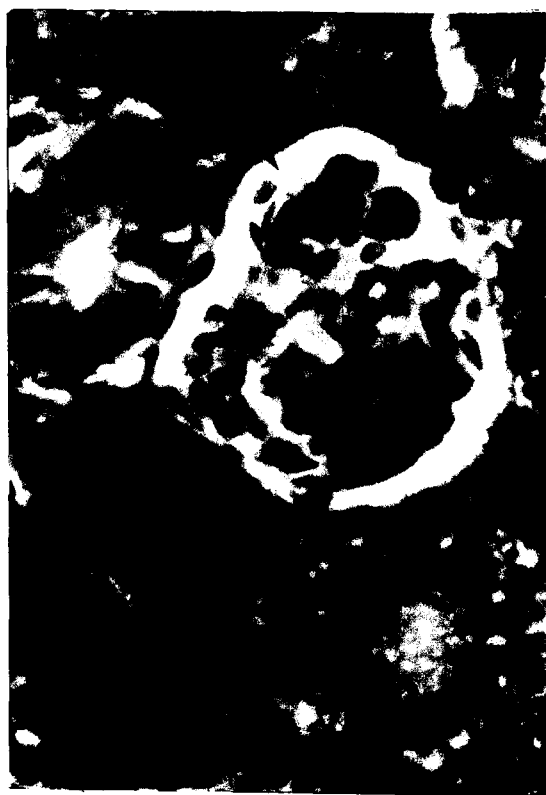
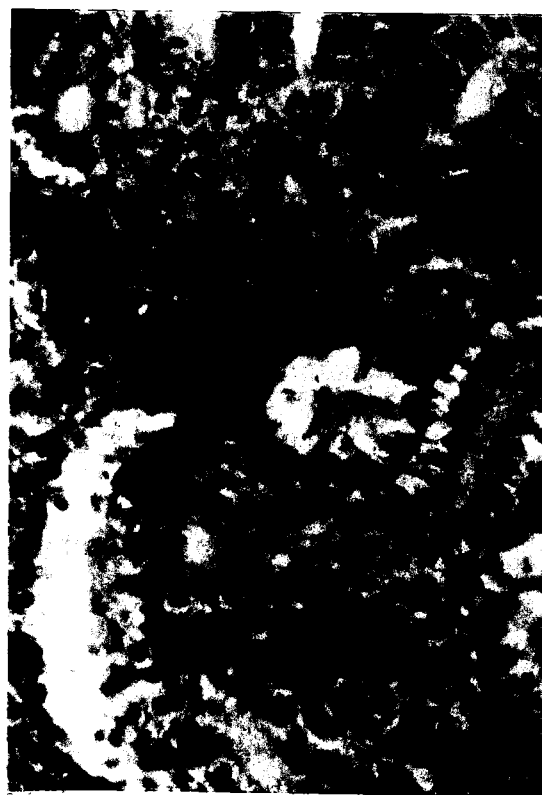
Figura 4. Rim (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 3043

Detalhe de um túbulo proximal, apresentando uma vacuolarização (TU).

ESTAMPA XVII



ESTAMPA XVIII

Figura 1. Rim (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 761

Tecido hematopoético (TH) menos denso. Túbulos (TU).

Figura 2. Rim (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 761

Corpúsculo com o espaço de "Bowman" dilatado (seta).

Figura 3. Rim (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)

Tricrômico de Masson

x 761

Tecido hematopoético menos denso, espaço de "Bowman" dilatado.

Figura 4 Rim (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)

Ácido Rubeânico- Eosina

x 487

Reacção positiva ao cobre nos túbulos e no tecido hematopoético (setas).

Figura 5. Rim (indivíduo contaminado-23 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=50 mg.l^{-1} CaCO_3)

Azul de Alcian (Mowry)

Melanomacrofagos (MF). Tecido hematopoético (TH) e túbulos (TU).

•A barra representa 10 μm .



ESTAMPA XIX

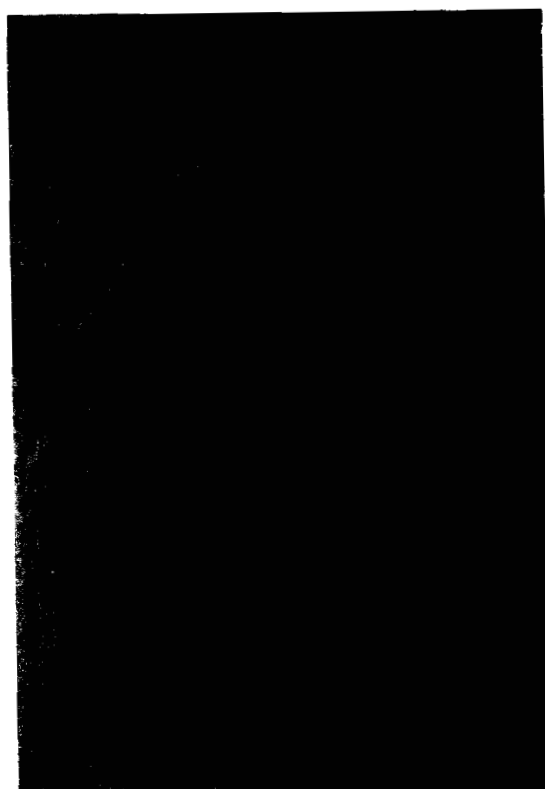
Figura 1. Baço (indivíduo "testemunha")
Azul de Alcian (Mowry)
x 761
Estrutura normal mostrando a polpa vermelha (PV) e a polpa branca (PB).

Figura 2. Baço (indivíduo "testemunha")
Ácido Rubeânico- Eosina
x 761
Ausência de grânulos "negro esverdeados" de cobre.

Figura 3. Baço (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)
x 761
Densificação da polpa vermelha.

Figura 4. Baço (indivíduo contaminado- $23 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza= 50 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico- Eosina
x761
Penetração do cobre no interior do tecido (setas).

ESTAMPA XIX



ESTAMPA XX

Figura 1. Baço (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Diminuição da densidade da polpa vermelha (anemia).

Figura 2. Baço (indivíduo contaminado-55 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=100 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico-Eosina

x 761

Penetração do cobre no interior do tecido (setas).

Figura 3. Baço (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Azul de Alcian (Mowry)

x 761

Diminuição da densidade da polpa vermelha (anemia).

Figura 4. Baço (indivíduo contaminado-150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; dureza=300 mg.l^{-1} CaCO_3)
Ácido Rubeânico-Eosina

x 761

Concentração de cobre num centro melanomacrofágico em formação (seta).

ESTAMPA XX



ESTAMPA XXI

Figura 1. Brânquia (indivíduo "testemunha" - pH 8)
Tricrômico de Masson
x 487
Lamelas secundárias evidentes(LS). Espaço interlamelar colmatado (seta).

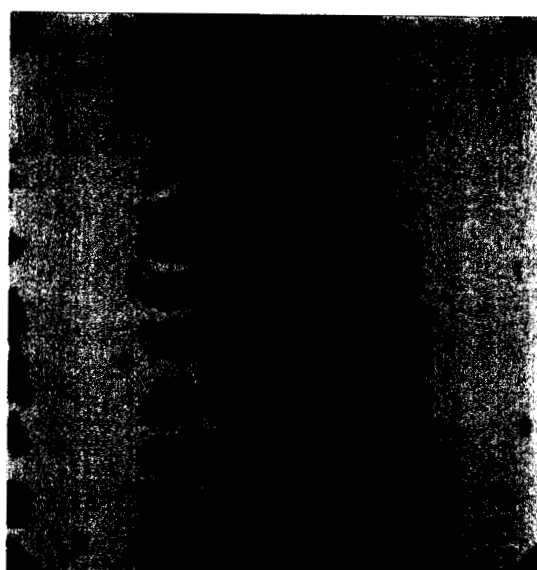
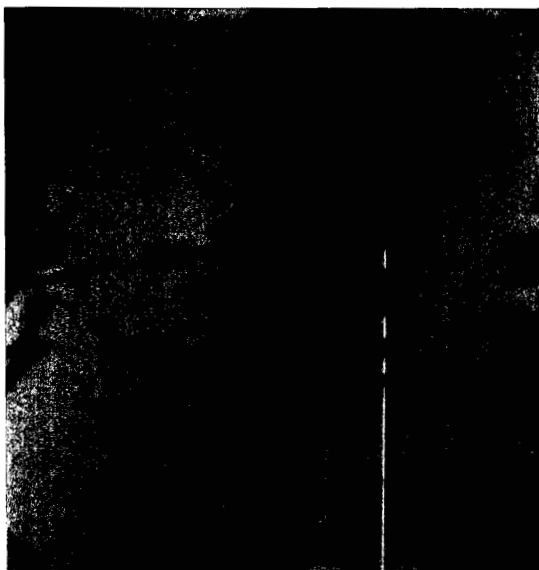
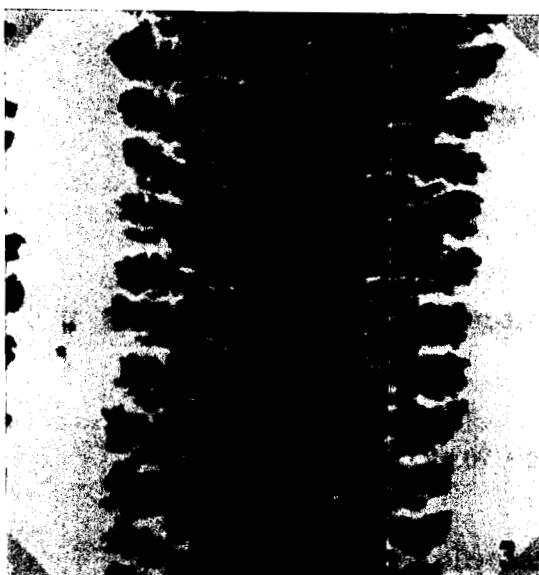
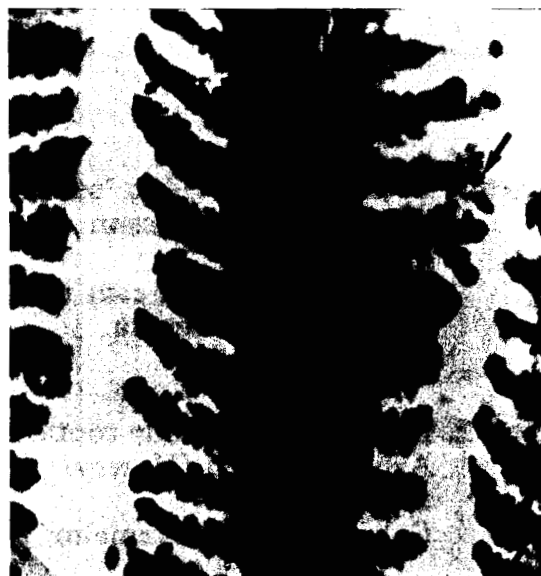
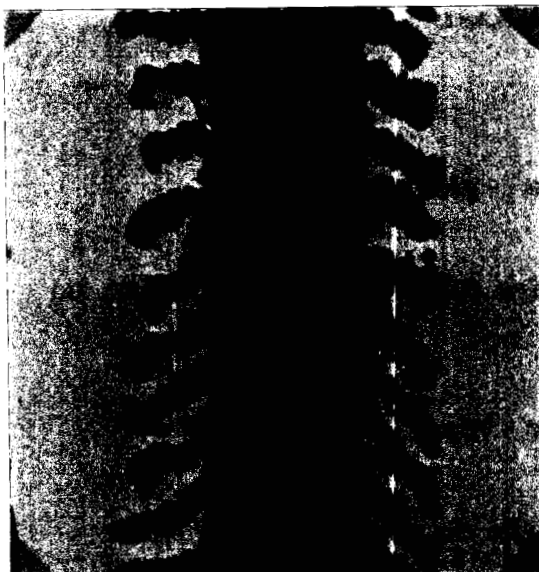
Figura 2. Brânquia (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 5)
Tricrômico de Masson
x 487
Descamações (seta). Colmatção do espaço interlamelar.

Figura 3. Brânquia (indivíduo "testemunha" - pH 6)
Tricrômico de Masson
x 487
Colmatção do espaço interlamelar (80%).

Figura 4. Brânquia (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 6)
Tricrômico de Masson
x 487
Colmatção total do espaço interlamelar.

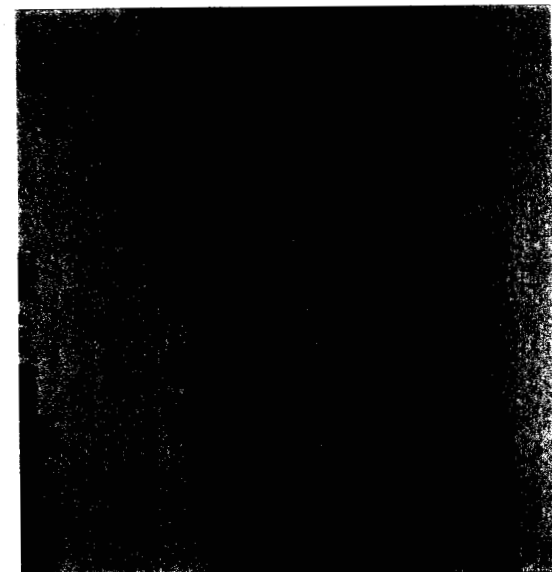
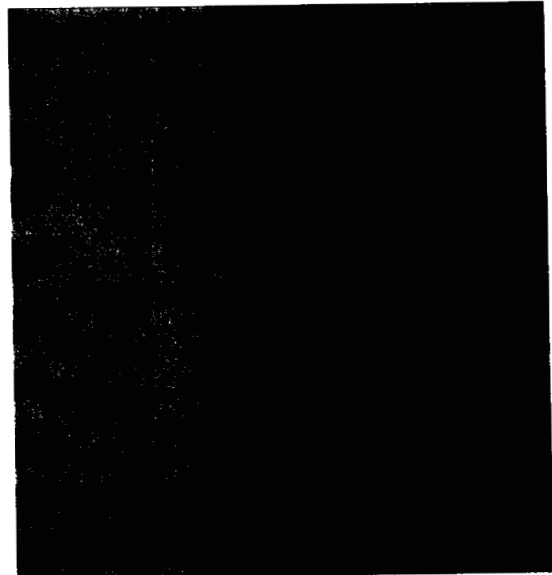
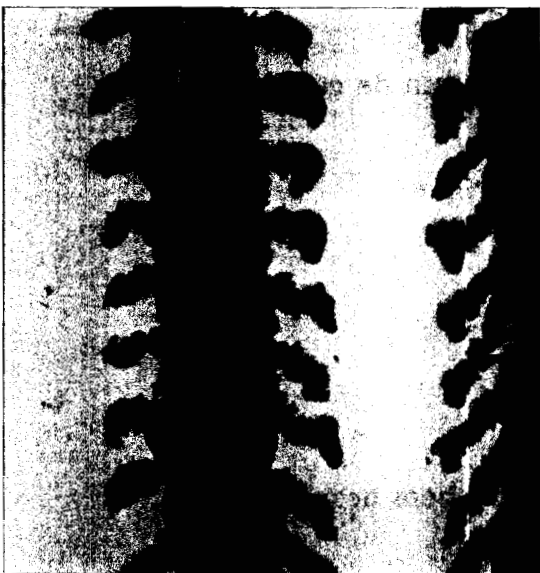
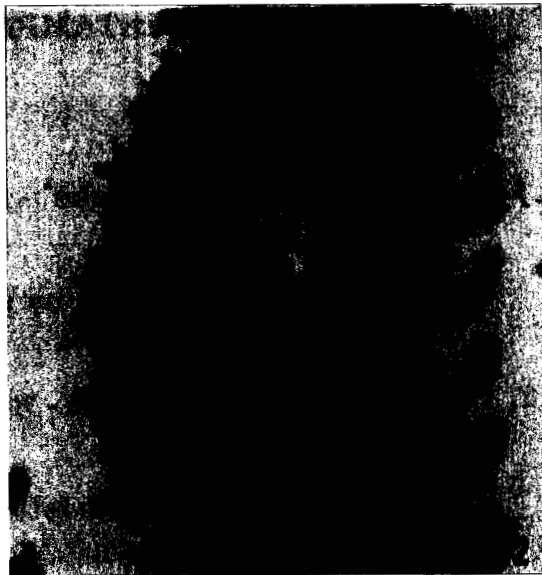
Figura 5. Brânquia (indivíduo "testemunha" - pH 7)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Ligeira colmatção do espaço interlamelar (seta). Poucas células secretoras de muco (setas).

Figura 6. Brânquia (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 7)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Colmatção interlamelar. Aumento da produção de muco (M).



ESTAMPA XXII

- Figura 1.** Brânquia (indivíduo "testemunha" - pH 8)
Tricrômico de Masson
x 487
Estrutura normal com uma ligeira colmatação interlamelar, no início da experiência.
- Figura 2.** Brânquia (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 8)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Colmatação interlamelar. Produção de muco (M).
- Figura 3.** Brânquia (indivíduo "testemunha" - pH 9)
Tricrômico de Masson
x 487
Estrutura normal. Colmatação interlamelar.
- Figura 4.** Brânquia (indivíduo "testemunha" - pH 9)
Azul de Alcian
x 487
Estrutura normal. Colmatação interlamelar. Poucas células secretoras de muco (M).
- Figura 5.** Brânquia (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 9)
Tricrômico de Masson
x 487
Colmatação interlamelar. Descamação (seta).
- Figura 6.** Brânquia (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 9)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Aumento da secreção de muco (M).



ESTAMPA XXIII

Figura 1. Pele (indivíduo "testemunha" - pH 5)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Células secretoras de muco na epiderme (E) em número reduzido.

Figura 2. Pele (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 5)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Células de muco cobrindo a totalidade da epiderme (setas).

Figura 3. Pele (indivíduo "testemunha" - pH 6)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
"Células de alarme"(S) e camada descontínua de células de muco.

Figura 4. Pele (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 6)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Necroses (N) e edema da derme compacta.

Figura 5. Pele (indivíduo "testemunha" - pH 7)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Actividade das células secretoras de muco bem desenvolvida.

Figura 6. Pele (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 7)
Azul de Alcian (Mowry)
x 487
Muco englobando detritos celulares (M).



ESTAMPA XXIV

Figura 1. Pele (indivíduo "testemunha" - pH 8)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Estrutura normal. Poucas células de muco.

Figura 2. Pele (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 8)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Aumento da secreção de muco (setas).

Figura 3. Pele (indivíduo "testemunha" - pH 9)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Importante actividade secretora de muco.

Figura 4. Pele (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 9)

Azul de Alcian (Mowry)

x 487

Estrutura idêntica ao indivíduo "testemunha", apresentando uma menor espessura da epiderme (E).



ESTAMPA XXV

Figura 1. Intestino (indivíduo "testemunha" - pH 8)

Tricrômico de Masson

x 192

Estrutura normal. Vilosidades bem desenvolvidas (V).

Figura 2. Intestino (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 8)

Azul de Alcian (Mowry)

x 192

Células secretoras de muco regularmente repartidas na lâmina epitelial (LE).

Figura 3. Intestino (indivíduo "testemunha" - pH 5)

Tricrômico de Masson

x 192

Estrutura normal. Vilosidades bem desenvolvidas (Estrutura semelhante à da figura 1).

Figura 4. Intestino (indivíduo "testemunha" - pH 5)

Azul de Alcian (Mowry)

x 192

Aumento da secreção de muco na lâmina epitelial (LE).

Figura 5. Intestino (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 5)

Tricrômico de Masson

x 192

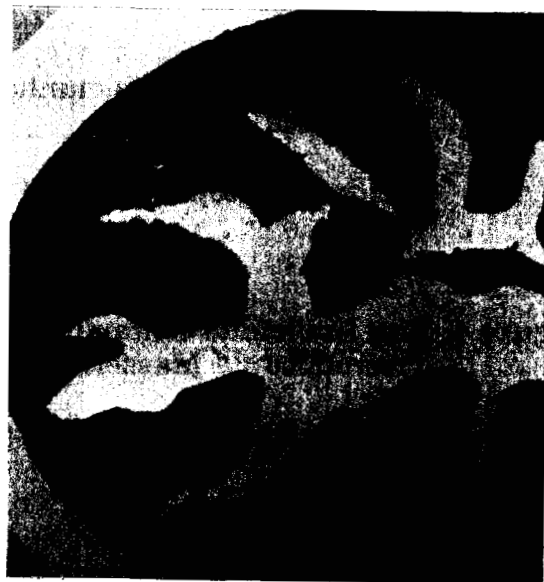
Alteração da estrutura das vilosidades.

Figura 6. Intestino (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH -5)

Azul de Alcian (Mowry)

x 192

Secreção abundante de muco. Tecidos necrosados envolvidos no muco, no interior do canal intestinal (seta).



ESTAMPA XXVI

Figura 1. Fígado (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 6)

Tricrômico de Masson

x 487

Degenerescência hepática.

Figura 2. Fígado (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 5)

Tricrômico de Masson

x 487

Degenerescência hepática. Trombose das sinusoides venosas (setas).

Figura 3. Rim (indivíduo "testemunha" - pH 5)

Tricrômico de Masson

x 761

Tecido hematopoético (TH) apresentando trombozes.

Figura 4. Rim (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 5)

Tricrômico de Masson

x 761

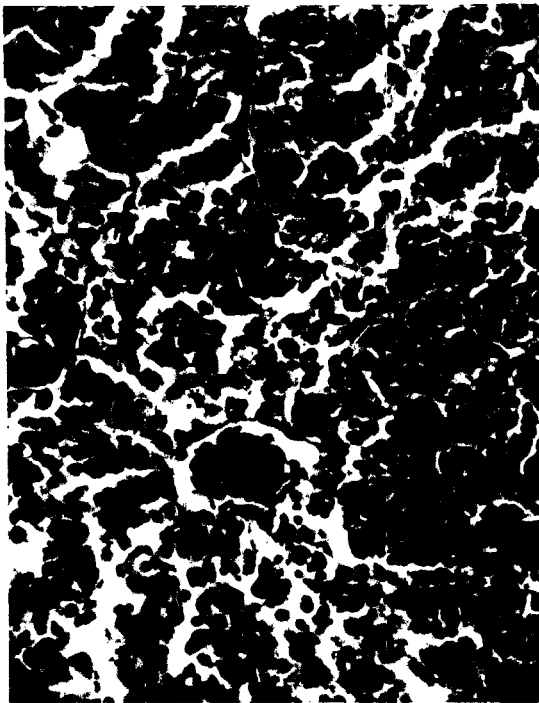
Alteração do tecido hematopoético, necroses e edema.

Figura 5. Baço (indivíduo contaminado - $70 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cu; pH 5)

Tricrômico de Masson

x 192

Aspecto geral. Polpa vermelha dominante. "Ilhotas" da polpa branca bem individualizadas (setas).



6.4 Síntese da discussão dos resultados

Com o objectivo de integrar a informação obtida com as diferentes fases experimentais deste estudo e preparar as respectivas conclusões, apresenta-se uma síntese da discussão de resultados, salientando os seus aspectos mais relevantes.

Com o estudo da toxicidade aguda, constatou-se a influência da dureza na letalidade do cobre para *Cyprinus carpio* L. confirmando-se os resultados obtidos por outros autores em estudos semelhantes, isto é, os níveis de tolerância do organismo ao tóxico crescem com o aumento da dureza, sendo possível correlacionar este parâmetro com a CL 50-48h. Considerando que em intoxicação aguda o período de intoxicação foi muito curto (48h), o estudo histológico dos organismos incidiu apenas na identificação de causas de letalidade do tóxico, não se considerando variações de dureza que certamente não conduziriam a resultados perceptíveis ao nível dos tecidos. Assim, o exame histológico dos órgãos directamente em contacto com o tóxico (brânquia, pele e intestino) evidenciou como principais causas de letalidade, um significativo aumento da secreção de muco naqueles órgãos, bem como um edema generalizado das brânquias, uma diminuição da espessura da epiderme, apresentando necroses, e lesões das vilosidades intestinais. Por outro lado, a microanálise confirmou claramente a presença de cobre nas brânquias, sendo menos evidente no intestino e negativa na pele, o que se admite ser consequência das descamações do epitélio.

Com o estudo da intoxicação subletal, foi possível comparar a acumulação de cobre em tecidos de alguns órgãos de *Cyprinus carpio* L. por variação da concentração de metal, da dureza e do pH do meio. As concentrações nos tecidos variaram directamente com o aumento da dureza, sendo o fígado o órgão em que, comparativamente, se registaram os valores mais elevados. Para doses de intoxicação substancialmente inferiores à CL 50-48h (0.3 e 0.4) verificou-se uma mortalidade bastante superior (100% ao fim de 1 semana) evidenciando que a resistência dos organismos não é apenas condicionada pela dose de intoxicação, mas também pelo respectivo período de exposição. Adoptando um formalismo proposto para modelizar a acumulação-eliminação de um metal em peixes, estimaram-se valores de "vida

média" do cobre em *Cyprinus carpio* L. para diferentes durezas. Constatou-se que o período de eliminação do metal varia directamente com a dureza, isto é, uma variação semelhante à variação de cobre nos tecidos. No entanto a análise dos valores obtidos para os factores de concentração é indicativa de uma variação inversa relativamente à acumulação do cobre.

Apesar de se considerar a fracção de 0.2 da CL 50-48h como a concentração máxima admissível de tóxico para uma frequência de 95% (Alabaster e Lloyd,1980), os estudos histológico e histoquímico, relativos à dose referida revelam ter havido penetração de cobre nos tecidos estudados, tendo uma acção desfavorável sobre a fisiologia geral do peixe. O efeito do cobre na maior parte dos órgãos aumenta com a dureza do meio e com a concentração do metal, causando alterações importantes à estrutura branquial, interferindo assim com o transporte iónico. Constata-se ainda o aparecimento de anemia, identificada pela diminuição da densidade da polpa vermelha do baço e uma diminuição da produção do tecido hematopoético do rim, assim como degenerescências do parênquima hepático. Verifica-se que o intestino é o órgão menos sensível, não se detectando manifestações patológicas para qualquer das concentrações utilizadas. Por outro lado, mantendo constante a dureza e fazendo variar o pH do meio verificou-se, através do exame histológico, que em meio ácido as estruturas dos tecidos estudados (à excepção do baço e fígado) são danificadas. A associação de uma dose de cobre ao pH ácido do meio conduziu, nos mesmos tecidos, a efeitos bastante mais importantes (à excepção do baço).

Os resultados obtidos nas experiências em intoxicação gradual, permitiram verificar a capacidade de adaptação e de acumulação dos organismos para o cobre, suportando doses que em intoxicação crónica conduziram a mortalidades de 100%.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

O estudo da toxicidade do cobre para *Cyprinus carpio* L. permite concluir que a tolerância desta espécie, representativa da classe dos ciprinídeos, é superior à da generalidade dos salmonídeos, traduzindo-se em Concentrações Máximas Admissíveis de Tóxico mais elevadas, pelo que se considera que as normas de qualidade da água deveriam adequar-se às duas classes de peixes e não apenas aos salmonídeos.

A influência das características físico-químicas do meio na toxicidade do cobre para *Cyprinus carpio* L. foi claramente identificada para a dureza e para o pH, podendo concluir-se que a dureza atenua, aparentemente, os efeitos do metal. Com efeito, os valores da CL 50-48h aumentam com o valor da dureza, indicando portanto maior tolerância do organismo, mas aumentam também as concentrações de cobre nos tecidos, provocando lesões mais importantes como se verificou pelos estudos histológicos e histoquímicos. No entanto, a acumulação relativa, avaliada pelo factor de concentração, tem uma variação inversa, sendo superior nas durezas mais baixas. Constata-se assim que os iões que determinam a dureza, principalmente o cálcio, embora interferindo com a permeabilidade da membrana celular, não impedem os efeitos tóxicos do metal. Através do estudo da toxicidade crónica (subletal), conclui-se que a dureza influencia a resposta dos organismos de forma semelhante. Estas experiências permitiram concluir que a tolerância de *Cyprinus carpio* L. não é apenas função da dose de intoxicação, mas depende também do período de exposição. Por outro lado, foi evidente a capacidade adaptativa do organismo, manifestada por um acréscimo de tolerância ao cobre quando gradualmente intoxicado.

Comparando as quantidades de cobre que se acumularam nos órgãos de *Cyprinus carpio* L., conclui-se que o fígado é o órgão em que se verifica a acumulação mais importante, o que se admite ser consequência da sua capacidade para formar metalotioninas, sendo no músculo que se observam as menores concentrações do metal.

O exame histológico permitiu concluir que em intoxicação aguda as manifestações histopatológicas dos órgãos que se encontram em contacto directo com o meio (brânquia, pele e intestino), traduzem-se

por uma reacção de "stress" que se manifesta por uma importante secreção de muco, associada a fenómenos de secreção de "substâncias de alarme". Se esta primeira barreira é ineficaz, verifica-se uma alteração irreversível da estrutura dos epitélios (brânquias, pele e intestino), conduzindo à morte dos organismos. A fracção de 0.2 da CL 50-48h provoca já alterações da estrutura dos tecidos estudados, tendo-se observado que para a pele, este teor tem efeitos tanto mais graves, quanto mais baixa for a dureza da água. Este aspecto põe em questão a definição da Concentração Máxima Admissível de Tóxico em frequência anual para os ciprinídeos, concentração fixada a 0.2 da CL 50-48h para uma frequência de 95% (Alabaster e Lloyd, 1980). A definição desta frequência aceitável de tóxico, deverá também ser corrigida tendo em consideração a variação do pH. Verificou-se existir uma sinergia entre o pH do meio e baixas concentrações de cobre. Em função do órgão estudado, a sinergia pH/cobre afecta as funções vitais, tais como a respiração (brânquia e pele); a osmorregulação, excreção (brânquia, pele e rim); a nutrição (intestino e fígado); a hematopoeese (rim e baço).

Através do exame histoquímico foi possível concluir haver uma efectiva penetração de cobre nos tecidos estudados. Por outro lado, utilizando-se uma técnica de microanálise (L.A.M.M.A.), confirmou-se a penetração do cobre, especialmente na brânquia em intoxicação aguda.

Conclui-se que os efeitos do cobre em *Cyprinus carpio* L. variam não só com o tipo de intoxicação a que o organismo é sujeito, como também com as características do meio. Nestas circunstâncias, parece questionável a representatividade da CL 50 para avaliar a toxicidade, podendo considerar-se este parâmetro apenas como um indicador que permite estabelecer, em curto espaço de tempo, ordens de grandeza dos teores em que um determinado produto pode por em risco a vida dos sistemas aquáticos. Admite-se, no entanto, que a sua representatividade melhoraria se se tipificassem, à semelhança dos tóxicos de referência, organismos e características físico-químicas do meio. Neste sentido, crê-se que *Cyprinus carpio* L. poderia considerar-se como uma espécie representativa da classe dos ciprinídeos, dada a sua dispersão nos meios aquáticos, especialmente em rios.

Como trabalho subsequente, o estudo da toxicidade do cobre tendo em conta a sua especiação poderá, apesar da complexidade química dos sistemas aquáticos, se for associado a exames histológicos e histoquímicos, permitir aprofundar aspectos fundamentais dos efeitos do metal. Neste âmbito, o estudo da formação e evolução das metalotioninas em função das espécies químicas presentes no meio, poderá vir a permitir a sua utilização como indicador de toxicidade, por forma a procurar aumentar a precisão da análise da resposta comportamental dos organismos e prosseguir na via de avaliação dos produtos tóxicos, pela determinação de testes que não provocam efeitos nos organismos, a qual se considera que potencia a minimização de impactes ambientais.

O estudo evidencia a necessidade de se identificarem condições de eliminação de tóxicos, comparando a respectiva cinética com a de acumulação por forma a poder-se aprofundar os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta dos organismos. Por outro lado, a avaliação de sinergias de tóxico(s)/características do meio, poderá conduzir a normalização de novos testes de toxicidade, com aplicação na monitorização contínua dos meios aquáticos, isto é, que permitam melhorar o respectivo controlo de qualidade sem recorrer a técnicas muito sofisticadas e de elevado custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaseth, J., T. Norseth. 1986. Copper in L. Friberg *et al.*, eds., *Handbook on the toxicology of metals*, 2nd ed. vol. 2. Specific Metals. Elsevier, Amsterdam. 233-254.

Adelman, I.R., Jr. Smithesp, G.D. Siesennop. 1976. Acute toxicity of sodium chloride, pentachlorophenol, guthion and hexavalent chromium to fathead minnows (*Pimephales promelas*) and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **33**, 203-298.

Adelman, I.R., L.L. Smith, G.D. Siesennop. 1976. Effect of size or age of goldfish and fathead minnows on use of pentachlorophenol as a reference toxicant. *Water Res.*, **10**, 685-687.

Adelman, I.R., L.L. Smith. 1972. Toxicity of hidrogen sulphide to goldfish (*Carassius auratus*) as influenced by temperature, oxygen and bioassay techniques. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **29**, 1039-1317.

AFNOR. 1974. Determination de l'inhibition de la mobilité *Daphnia magna* straus (Crustacés, Cladocère). Norme expérimental T 90-301.

AFNOR. 1978. Determination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de *Brachydanio rerio* (essai-statique). Norme expérimentale T 90.303.

AFNOR. 1983. Recueil de normes françaises des eaux; méthodes d'essai, AFNOR, 2ème éd. Paris.

AFNOR. 1984. Essais des eaux. Determination de la toxicité aigue d'une substance vis-a-vis de *Salmo gairdneri*. Methodes sans renouvellement et avec renouvellement continue du milieu. Norme expérimentale T 90. 305.

Alabaster, J.S., R. Lloyd. 1980. *Water quality criteria for freshwater fish*. Butterworths ed., London-Boston, 189-214.

Albouy, L., L.N. Conde, F. Foglierini, X. Leca, A. Morikis. 1981. Le gisement de sulfures massifs polymétalliques de Neves-Corvo (Baixo Alentejo, Sud Portugal). Chronique de la recherche minière, nº 460.

Alderdice. 1963. Citado por Davis e col., 1975.

Alexander, F.W., B.E. Clayton, H.T. Delves. 1974. *Copper in Handbook on the toxicology of metals* , edited by L. Friberg *et al* ., 1979. Elsevier.

Anderson, B.G., D.L. Mitchum. 1974. *Atlas of trout histology*. Wyoming Game and Fish Department.

Andrew, R.W., K.E. Biesenger, G.E. Glass. 1977. Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Water Res.*, **11**, 309-315.

APHA, AWWA, and WPCF. 1981. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 15th ed. Washington, D.C., American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation.

Arthur, J.W., J.A. Zische, G.L. Erickson. 1982. Effect of elevated water temperature on macroinvertebrate communities in outdoor experimental channels. *Water Res* ., **16**, 1465-1477.

ASTM, 1980 a. American society for testing and materials: Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. ASTM E 729-80. Philadelphia.

Baker, J.T.P. 1969. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *J. Fish.Res.Board. Can.* **26**, 2785-2793.

Baker, R.J., M.D. Knittel, J.L. Fryer. 1983. Susceptibility of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to infection with *Vibrio anguillarum* following sublethal copper exposure. *J. Fish Dis* ., **6**, 267-275.

Ball, I.R. 1976 a. The relative susceptibilities of some species of freshwater fish to poisons. I. Amonia, *Water Res* ., **1**, 767-775.

Barbier, B., G. Leynaud, P.Champ. 1974. Les tests de toxicité sur les poissons T.S.M. L'eau. **69** (6), 346-350.

Bardach, J. 1972. *Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms* . Wiley Interscience. New York, London, Sidney, Toronto.

Baudouy, A.M., C. Michel. 1980. Les dominantes pathologiques en pisciculture d'étang. *in* Billard R., *La pisciculture en étang* . IONRA Publ., Paris, 361-371.

Baudouy, A.M., M. Danton, G. Merle. 1980. Virémie printanière de la carpe: étude expérimentale de l'infection évoluant à différents températures. *Ann. Virol.* (Inst. Pasteur), **131 E**, 479-486.

Bellavere C., J. Gorbi. 1981. A comparative analysis of acute toxicity of chromium copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Biomphalaria glabrata* and *Brachydanio rerio* . *Environ. Technol. Lett.* , **2**, 119-124.

Benguria, R.L., M.H. Caminã. 1975. *Peces de mar y rio* . ed. Asuré-Urmo.

Bennett, R.O., J.K. Dooley. 1982. Copper uptake by two sympatric species of killifish *Fundulus heteroclitus* (L.) and *F. Majalis* (Walbaum). *J. Fish Biol.*, **21**, 381-398.

Bhave, S.A., A.N. Pandit, M.S. Tanner. 1987. Comparison of feeding history of children with Indian childhood cirrhosis and paired controls. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **6**, 562-567.

Biegert, E.K., V. Valkovic. 1980. Acute toxicity and accumulation of heavy metals in aquatic animals. *Period. Biol.* **82** (1), 25-31.

Borgman, U., K.M. Ralph. 1983. Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. *Water Res.* **17**, 1697-1703.

Borgmann, U. 1981. Determination of free metal ion concentrations using bioassays. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**, 992-1002.

Boudou. A. 1982. Recherche en écotoxicologie expérimentale sur les processus de bioaccumulation et de transfert des dérivés du mercure dans les systèmes aquatiques continentaux. Thèse d'état, Univ. de Bordeaux I, 299p.

Bouquegneau, J.M., C. Gerday, A. Disteche. 1975. Fish mercury-binding thionein related to adaptation mechanisms. FEBS (Federation of European Biochemical Societies) *Letters* **55**, 173-177.

Bradley, R.W., C. Duquesnay, J.B. Sprague. 1985. Acclimation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to zinc: kinetics and mechanism of enhanced tolerance induction. *J. Fish. Biol.* **27**, 367-379.

Bradley, R.W., J.B. Sprague. 1985. The influence of pH, water hardness, and alkalinity on the acute lethality of zinc to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 731-736.

Brady, F.O. 1982. The physiological function of metallothionein. *Trends in Biochemical Sciences* . **7**, 143-145.

Brown, B.T., B.M. Rattigan. 1979. Toxicity of soluble copper and other metal ions to *Elodea canadensis*. *Environ. Pollut.* **12**, 303-314.

Brown, V.M. 1968. The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout. *Water Res.* , **2**, 723-733.

Brown, V.M. 1981. The analysis and interpretation of acute toxicity test data. in "Les Colloques de l'INSERM: Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique" INSERM, **106**, 475-484.

Brown, V.M., T.L. Shaw, D.G. Shurben. 1974. Aspects of water quality and the toxicity of copper to rainbow trout. *Water Res.* **8** (10), 797-803.

Brungs, W.A., J.R. Geckler, M. Gast. 1976. Acute and chronic toxicity of copper to the fathead minnow in a surface water of variable quality. *Water Res.* **10**, 37-43.

Buckley, J.A., G.A. Yoshida, N.R. Wells. 1984. A cupric ion-copper bioaccumulation relationship in coho salmon exposed to copper - containing treated sewage. *Comp. Biochemical Physiol.*, **73 C**, 105-111.

Buikema, A.L. Jr., B.R. Niederlehner, J. Jr., Cairns. 1982. Biological monitoring. IV. Toxicity testing. *Water Res.* , **16**, 239-262.

C.E.E. 1978. Directiva do Conselho relativa à qualidade das águas doces que necessitam de ser protegidas ou melhoradas a fim de estarem aptas para a vida dos peixes. (78/659/CEE) *J.O. Comm. Eur.*, L 222/1, 111-120

Cairns, J., A.G. Heath, B.C. Parker. 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hidrobiologia* **47**, 135-171.

Calamari, D., R. Marchetti, G. Vailati. 1980. Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri*. *Water Res* . **14**, 1421-1426.

Calamari, D., R. Marchetti. 1973. The toxicity of mixtures of metals and surfactants to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich). *Water Res* .**7**, 1453-1464.

Chakoumakos, C., R.C. Russo, R.V. Thurston. 1979. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. *Environ. S. Technol.* **13**, 213-219.

Chapman, G.A.. 1978. Toxicities of cadmium, copper and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead. *Trans. Am. Fish. Soc* . **107**, 841-847.

Cherian, M.G., M. Nordberg. 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicolog* **28**, 1-15.

Cherian, M.G., R.A. Goyer. 1978. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sciences* **23**, 1-10.

Clarke, R.McV. 1974. The effects of effluents from metal mines on aquatic ecosystems in Canada. A literature review. Fisheries and Marine Service Technhical Report, 488.

Courtois, L.A. 1976. Copper intoxication - a possible biochemical homologue. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **15** (2), 205-210.

Crist, R.H., K. Oberholser, N. Shank, M. Nguyen. 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell wells. *Environ. Sc. Tech* . **15** (10), 1212-1217.

Crochard, C. (Comunicação pessoal) Preparação das amostras para leitura através do LA.M.M.A. Laboratoire d'Ecologie de Metz.

Cuthbert, A.W., J. Maetz. 1972. The effects of calcium and magnesium on sodium fluxes through the gills of *Carassius auratus*, L. *J. Physiol* . **221**, 633-643.

Daramola, J.A., A.A. Oladimeji. 1989. Accumulation of copper in *Clarias anguillaris* L. and *Oreochromis niloticus* L., *Water, Air and Soil Pollut* . **48**, 457-461.

- Davis, J.C., Hoos, M. Raw.** 1975. Use of pentachlorophenate and dehydroabietic acid as reference toxicants for salmonid bio-assayss. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **32**, 411-416.
- Daye, P.G., E.T. Garside.** 1980. Structural alterations in embryos and alevins of the atlantic salmon, *Salmo salar*, induced by continuous or short-term exposure to acidic levels of pH. *Can. J. Zool.* **58**, 27-43.
- de Kinkelin, P., A.M. Hattenberg.** 1986. Les dominants pathologiques chez la carpe et les Cyprinides d'élevage, in Billard R., *Aquaculture of Cyprinids*. INRA. Publ., Paris.
- de Kinkelin, P., C. Michel, P. Ghittino.** 1985. *Precis de pathologie des poissons*. INRA. Paris, 348p.
- de Kinkelin, P., M. Dorson, A.M. Hattenberg-Baudouy.** 1982. Interferon synthesis in trout and carp after viral infection. *Develop. Comp. Immunol.*, Sup. **2**, 167-174.
- Demayo A., M.C. Taylor, K.W. Taylor.** 1982. Effects of copper on humans, laboratory and farm animals, terrestrial plants, and aquatic life. *Crit. Rev. Chem.* **12**, 183-255.
- Dixon, D.G., J.B. Sprague.** 1981. Copper bioaccumulation and hepatoprotein synthesis during acclimation to copper by juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **1**, 69-81.
- Dobos P., D. Rowe.** 1977. Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *J. Virol.* **24**, 805-820.
- Dorson M., J. Castric, C. Torchy.** 1978. Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids: biological and antigenic features of a pathogenic strain and non pathogenic variant selected in RGT-2 cells. *J. Fish Dis.* **1**, 309-320.
- Drummond, R.A., W.A. Spoor, G.F. Olson.** 1973. Short-term indicators of sublethal effects of copper on brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **30**, 698-701.
- EIFAC/T 27.** 1976. Critères de qualité des eaux pour les poissons d'eau douce Europeens. Rapport sur le cuivre et les poissons d'eau douce. FAO.

- Emmerich, W.E., L.J. Lund, A.L. Page, A.C. Chang.** 1982 a. Solid phase forms of heavy metals in sewage sludge treated soils. *J. Environ. Qual.* **11**, 178-181.
- Emmerich, W.E., L.J. Lund, A.L. Page, A.C. Chang.** 1982 b. Movement of heavy metals in a sewage sludge - treated soils. *J. Environ. Qual.* **11**, 174-178.
- Engel, D.W.** 1987. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: copper, zinc and metallothionein. *Biol. Bull.* **172**, 69-82.
- Euzébi, J.** 1984. *Les parasitoses humaines d'origine animale. Caractères épidémiologiques*. Flammarion Médecine Sciences, Paris, 324 p.
- Evans, G.W.** 1973. Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol. Rev.* **53**, 535-570.
- Fish and Water Quality Criteria.** 1974. Notes on water pollution, Water Research Centre, **65**, 1-4.
- Fisher, J.C., B. Ouddane, Douez, M. Wartel.** 1990. Sur la spéciation des métaux lourds dans les eaux naturelles. *Océanis* . **16** (4), 305-311.
- Florence, T.M. G.E. Batley.** 1977. Determination of the chemical forms of trace metals in natural waters with special reference to copper, lead, cadmium and zinc. *Talanta* . **24**, 151-158.
- Fogels A., J.B. Sprague.** 1977. Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. *Water Res.* **11**, 811-817.
- Förstner, U., G.T.W. Wittmann.** 1983. *Metal pollution in the aquatic environment*. 2^a ed. Springer-Verlag.
- Fromm, P.O.** 1980. A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Env. Biol. Fish.* **5**, 79-93.
- Gachter, R., K. Lum Shue Cahn, Y.K. Chan.** 1973. Complexing capacity of the nutrient medium and its relation to inhibition of algal photosynthesis by copper. *Revue Suisse d'Hydrologie* **2**, 252-261.

- Gardiner, J.** 1974. The chemistry of cadmium in natural water: a study of cadmium complex formation using the cadmium specific-ion electrode. *Water Res.* 8, 23-30.
- Gauter P., G. Jollès.** 1970. *Histochimie normale et pathologique* Ed. Gauthier-Villars. Paris.
- George, S.G., A. Viarengo.** 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. *in* Marine pollution and physiology. Recent advances. University of South Carolina Press, Columbia, 125-143.
- George, S.G., B.J. Pirie.** 1980. Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L.). A combined ultrastructural and biochemical study. *J. Mar. Biol.* 60, 575-590.
- Giddings, J.M.** 1983. Microcosms for the assessment of chemical effects on the properties of aquatic ecosystems. *in* Hazard assessment of chemicals: current developments . Vol.2, Academic Press, New York, 46-89.
- Giesy, J.P., R.L. Graney.** 1989. Recent developments in and inter comparisons of acute and chronic bioassays and bio-indicators. *Hydrobiol.*, 188/189, 21-60.
- Hamilton, S.J., P.M. Mehrle.** 1986. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metall contaminants. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 115, 596-609.
- Haque M.A., V. Subramaniam.** 1982. Copper, zinc and lead pollution of soil environment. *Crit. Rev. Chem.* 12, 13-68.
- Harrison, F.L.** 1986. The Impact of Increased Copper Concentrations on Freshwater Ecosystems. *in*: Hodgson, &, Ed., *Reviews in Environmental Toxicology* 117, Elsevier.
- Harrison, R.M., D.P.H. Laxen, S.J. Wilson.** 1981. Chemical associations of lead, cadmium, copper, and zinc in street dusts and roadside soils. *Environ. Sci. Technol.* 15, 1378-1383.
- Herbert, G.B., T.J. Peterle.** 1990. Heavy metals and organochlorine compound concentrations in tissues of raccoons from East-Central Michigan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 331-338.

Hermanutz, R.O., L.H. Mueller, K.D. Kempfert. 1973. Captan toxicity to fathead minnows (*Pimephales promelas*) bluegills (*Lepomis macrochirus*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **30**, 1811-1817.

Heslop, R.B., P.L. Robinson. 1967. *Inorganic chemistry - A guide to advanced study* , 3rd ed. Elsevier Publ. New York.

Hill, B.J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. *in* Roberts R.J., *Microbial diseases of fish* , Academic Press, 91-114.

Hobson, P.N., B.J. Shaw. 1976. Inhibition of methane production by *Methanobacterium formicicum* . *Water Res.* **10** (10), 849-852.

Howard, R.S. 1976. The effects of water hardness and pH on the acute toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) M. Sc. Thesis. University of Guelph. Ontario. Canada.

Howard, R.S., J.B. Sprague. 1978. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. *Water Res.* **12**, 455-462.

Huet, M. 1978. *Tratado de piscicultura* - 2^a Ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Hughes, G.M., J. Nemcsók. 1988. Effects of low pH alone and combined with copper sulphate on blood parameters of rainbow trout. *Environmental Pollution* **55**, 89-95.

Hutchinson, N.J., J.B. Sprague. 1987. Reduced lethality of Al, Zn, and Cu mixtures to american flagfish by complexation with humic substances in acidified soft waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **6**, 755-765.

Hutchinson, T.C. 1979. Copper contamination of ecosystems caused by smelter activities. *in* *Copper in the Environment. I Part: Ecological Cycling* (J.O. Nriagu, Ed.). 487-502. Wiley, New York.

Jackson, T.A. 1978. The biogeochemistry of heavy metals in polluted lakes and streams at Flin Flon, Canada, and a proposed method for limiting heavy metal pollution of natural waters. *Environ. Geol.* **2**, 173-189.

Jensen, M.L., A.M. Bateman. 1981. *Economic mineral deposits* . 3rd Ed. Revised printing. John Wiley and Sons, New York. 3-356.

- John, J., E.T. Gjessing, M. Grande, B. Salbu.** 1987. Influence of aquatic humus and pH on the uptake and depuration of cadmium by the atlantic salmon (*Salmo salar* L.) .*The Science of the Total Environment* . **62**, 253-265.
- Jozuka, K., H. Adachi.** 1979. Environmental physiology of the pH tolerance of teleost. I. Some inorganic factors affecting the survival of medaka, *Oryzias latipes*, exposed to low pH environment. *Jap. J. Ecol* . **29**, 221-227.
- Kagi, J.H.R., M. Nordberg (eds).** 1979. *Metallothionein*. Birkhauser Verlag, Basel.
- Karin, M.** 1985. Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* **41**,9-10.
- Khan, A.T.,J.S. Weis, L. D'Andrea.** 1989. Bioaccumulation of four heavy metals in two populations of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 339-343.
- Kito, H., T. Tazawa, Y. Ose, T. Sato,T. Isikawa.** 1982b. Formation of metallothioneins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology* **73**, 129-134.
- Klevay, L.M.** 1975. Copper in *Handbook on the toxicology of metals* edited by L. Friberg *et al.*, 1979. Elsevier.
- Korwin-Kossakowski, M.** 1988. Larval development of carp, *Cyprinus carpio* L., in acidic water. *J. Fish. Biol.* **32**, 17-26.
- Korwin-Kossakowski, M., B. Jezierska.** 1985. The influence of temperature on carp fry survival in acid water. *J. Fish. Biol.* **26**, 43-47.
- Kumaguru, A.K., F.W.H. Beamish.** 1981. Lethal toxicity of Permethrin to rainbow trout, *S. gairdneri* , in relation to body weight and temperature. *Water Res* . **15**, 503-505.
- Kwain, W.** 1975. Effects of temperature on development and survival of rainbow trout, *Salmo gairdneri* , in acidic water. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **32**, 493-497.
- Labat, R., J. Pequignot, A. Chaletet.** 1974. Action toxique du cuivre sur les branchies de carpe (*Cyprinus carpio*) *Annls. Limnol.*, **10** (1), 109-114.

- Laegreid M., J. Alstad, D. Klaveneses, H.M. Selp.** 1983. Seasonal variation of cadmium toxicity towards the alga *Selenastrum capricornutum* printz in two lakes with different humus content. *Environ.Sci.Technol.* **17** (6), 357-361.
- Lamers, C.H.T.** 1986. The imune system of cyprinid fish: a review in Billard R., *Aquaculture of Cyprinids* . INRA Publ., Paris.
- Laurén, D.J., D.G. McDonald.** 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol* . **155 B**, 635-644.
- Laurén, D.J., D.G. McDonald.** 1986. Influence of water hardness, pH, and alkalinity on the mecanismes of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* . **43**, 1488-1496.
- Laurén, D.J., D.G. McDonald.** 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: biochemistry. *Can. J. Fish. Aquat . Sci.* **44**, 105-111.
- Laurén, D.J., D.G. McDonald.** 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: physiology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **44**, 99-104.
- Leckie, J.O., J.A. Davis.** 1979. Aqueous environmental chemistry of copper. in *Copper in the environment. Part I: Ecological Cycling* (J.O. Nriagu, Ed.), John Wiley & Sons, New York, 89-121.
- Lee, R.M., S.D. Gerking.** 1980. Survival and reproductive perfomance of the desert pupfish, *Cyprinodon n. nevadensis* (Eigenmann and Eigenmann), in acid waters. *J. Fish Biol.* **17**, 507-515.
- Leivestad, H., G. Hendrey, J. P. Muniz, E. Snekvik.** 1976. Effects of acid precipitation on freshwater organisms. in *Impact of Acid Precipitation on Forest and Freshwater Ecosystems in Norway* (F.M. Braekke, ed.) Res., Rep. 6/76, SNSF-project, Norway.
- Lencastre, E.** (s.d.). Noções elementares de aquicultura. Secretaria de Estado de Agricultura - Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas.
- Levesque, L.** 1979. Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales; Rapport n°6 chrome, cuivre et nickel, AFEE. 189p.

Lidy, M.J., T.E. Wissing. 1988. Effect of sublethal concentrations of copper on the critical thermal maxima (CT Max) of the fantail (*Etheostoma flabellare*) and johnny (*E. nigrum*) darters. *Aquatic Toxicology* **12**, 311-322.

Litchfield, J.T.J.R. e F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. *J. Pharmac. Expr. Ther.*, **96**, 99-113.

Lloyd, R. 1960. Toxicity of zinc sulphate to rainbow trout. *Ann. Appl. Biol.* **48**, 84-94.

Lloyd, R. 1965. Factors that affect the tolerance of fish to heavy metal poisoning, p. 181-187. in C.M. Tarzwell (ed) Biological Problems in Water Pollution. 3rd Seminar, Aug. 13-17, 1962. U.S. Public Health Serv. Publ., No 999-WP, 1965, 25, 424p.

Lloyd, R. 1972. Problems in determining water quality criteria for freshwater fisheries. *Proc. R. Soc. Lond . B* **180**, 429-449.

Loneragan, J.F., A.D. Robson, R.D. Graham. 1981. Copper in soils and plants. Academic Press, Orlando, Fla/Sidney.

Luoma, S.N. 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms. A review, the *Science of the toatl Environment* **28**, 1-22.

Maarouf, A., 1988. Étude expérimentale de la bioaccumulation et du relargage du zinc chez *Dreissena polymorfa*. Thèse doct., Univ. de Metz, 188p.

Macek, K., W. Birge, F.L. Mayer, A.L. Buikema, A.W. Maki. 1978. Toxicological effects. in : Estimating the hazard of chemical substances to aquatic life, edited by J. Cairns, Jr. K.L. Dickson, A.W. Maki, p.27-32. ASTM STP 657. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.

Mackee, J.E., H.W. Wolg. 1963. Water quality criteria. The resources agency of California - State Water Quality Control Board, 550.

Maggiore, G.D., C. Giacomo, F. Cessa, G.R. Burgio. 1987. Idiopathic hepatic copper toxicosis in a child. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.* **6**. 980-983.

Malins, D.C. 1989. The use of environmental assays for impact assessment. *Hydrobiol.*, **188/189**, 87-91.

- Maltby, L., P. Calow.** 1989. The application of bioassays in the resolution of environmental problems; past, present and future. *Hydrobiol.*, **188/189**, 65-76.
- Manaham, S.E., M.J. Smith.** 1973. Copper nutrient requirement for algae. *Environ. Sc. Tech.* **7** (9), 829-833.
- Marghoshes, M., B.L. Vallee.** 1957. A cadmium protein from aquine kidney cortex. *The Journal of the American Chemical Society*, **79**, p.4813.
- Martoja, R., M. Martoja.** 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et Cte Ed. Paris.
- Massabuau, J.C.** 1985. Pluies acides et physiologie des animaux aquatiques. *Bull. Soc.Ecophysiol* , **10** (2), 59-74.
- Mc Donald, D.G., H. Hobe, C.M. Wood.** 1980. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* to low experimental pH. *J.Exp. Biol.* **88**, 109-131.
- Mc Williams, P.G.** 1982. The effects of calcium and sodium fluxes in the brown trout, *Salmo trutta*, in neutral and acid water. *J. Exp. Biol.* **96**, 439-442.
- McCarter, J.A., M. Roch.** 1984. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper - III. Kinetics of metabolism of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* **77C**, 83-87.
- McDonald, D.G.** 1983. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* . I. Branchial and renal net ion and H⁺ fluxes. *J. Exp. Biol.* **102**, 123-140.
- McIntosh, A.** 1974. Notes on the use of copper sulfate in ponds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **12**, 425-432.
- Miller, T.G., W.C. Mackay.** 1980. The effects of hardness, alkalinity and pH of the water on the toxicity of copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* **14**, 129-133.
- Miller, T.G., W.C. Mackay.** 1982. Relationship of secreted mucus to copper and acid toxicity in rainbow trout *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 68-72.
- Moore, J.W., S. Ramamoorthy.** 1984. *Heavy metals in natural waters* . Spring-Verlag, New York Inc. 77-99.

- Moriarty, F.** 1984. Persistent contaminants, compartmental models and concentrations along food chains. *in*: Rasmussen, S. (ed.) Ecotoxicology. Proceedings of the third oikos Conference Ecol. Bull. (Stockolm) **36**, 35-45.
- Mount, D.I., C.E. Stephan.** 1967. A method of establishing acceptable toxicant limits for fish-malathion and the butoxyethanol ester of 2,4-D. *Trans. Am. Fish. Soc.* **96**, 185-193.
- Mount, D.I., C.E. Stephan.** 1969. Chronic toxicity of copper to the fathead minnow, *Pimephales promelas*, in soft water. *J. Fish. Res. Board. Can.* **26**, 2449-2457.
- Mouretreau.** 1989. Programa EFFDOS. Comunicação pessoal. Laboratoire d'Ecologie de Metz.
- Mullins, G.L., D.C. Martens, W.P. Miller, E.T. Kornegay, D.L. Hallock.** 1982. Copper availability, form, and mobility in soils from three annual copper-enriched hog manure applications. *J. Environ. Qual.* **11**, 316-320.
- Muramoto, S.** 1982. Effects of complexants (EDTA and DPTA) on the toxicity of low concentrations of copper to fish. *J. Environ. Sci. Health, A* **17**, 313-319.
- Muus B.J., Dahlström.** 1973. *Guide des poissons d'eau douce et pêche.*
- Neff, J.M.** 1985. Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. American Society for Testing and Materials, Special Technical Publication. **854**, 155-183.
- Nelson, A., P. Donkin.** 1985. Processes of bioaccumulation: the importance of chemical speciation. *Mar. Pollut. Bull.* **16** (4). 164-169.
- Nelson, J.A.** 1982. Physiological observations on developing rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), exposed to low pH and varied calcium ion concentrations. *J. Fish. Biol.* **20**, 359-372.
- Nelson, J.A.** 1982. Physiological observations on developing rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), exposed to low pH and varied calcium ion concentrations. *J. Fish. Biol.* **20**, 359-372.

- Neubecker, T.A., H.E. Allen.** 1983. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Res.* **17**, 1-14.
- Noel-Lambot, F., C. Gerday, A. Disteche.** 1978. Distribution of Cd, Zn, and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology* **64**, 177-187.
- Nor, Y.M.** 1987. Ecotoxicity of copper to aquatic biota. A review. *Environ. Research*, **43**, 274-282.
- Nordberg, G.F., R.A. Goyer, T.W. Clarkson.** 1985. Impact of effects of acid precipitation on toxicity of metals. *Environ. Health Perspect.* **63**, 169-180.
- Nriagu, J.O.** 1979 b. *Copper in the Environment. Part I: Ecological Cycling*. Willey and Sons, New York. 1-17.
- O'Dell, B.L.** 1976. Copper in *Handbook on the toxicology of metals*, edited by L. Friberg *et al.*, 1979. Elsevier.
- Olafson, R.W., R.G. Sim, K.G. Boto.** 1979 b. Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B, Comparative Biochemistry* **62**, 407-416.
- Onosaka, S., K.S. Min, C. Fukuhara, K. Tanaka.** 1984. The role of metallothioneins on excess zinc metabolism in mouse. *Eiser Kagaku*, **30** (6), 371-376.
- Pagenkopf, G.K.** 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* **17**, 342-347.
- Pagenkopf, G.K., R.C. Russo, R.V. Thurston.** 1974. Effect of complexation on toxicity of copper to fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**, 462-465.
- Paul, A.C., K.C. Pillai.** 1983 a. Trace metals in a tropical river environment: distribution. *Water, Air, Soil Pollut.* **19**, 63-73.

Paul, A.C., K.C. Pillai. 1983 b. Trace metals a tropical river environment: speciation and biological transfer. *Water, Air, Soil Pollut* . **19**, 75-86.

Peres, I. J.C. Pihan. 1991 a. Copper LC 50 to *Cyprinus carpio*. Influence of hardness, seasonal variation, proposition of maximum acceptable toxicant concentration. *Environ. Tech.* **12**, 161-167.

Peres, I., J.C. Pihan. 1991 b. Study of accumulation of copper by carp (*Cyprinus carpio* L.) - Adaptation analysis of bioconcentration by the gills. *Environ. Tech.* **12**, 169-177.

Peterson, H.G., F.P. Healey, R. Wagemann. 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* . **41**, 974-979.

Peterson, R.H., P.G. Daye, J.L. Metcalfe. 1980. Inibition of atlantic salmon (*Salmo salar*), hatching at low pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* . **37**, 770-774.

Péquignot J., R. Labat, A. Chatelet. 1975. Action du sulfate de cuivre sur les cellules à mucus de l'alevin de truite (*Salmo iridens*). *Journ. Européen de toxicologie* **8** (1). 52-56.

Phillips, D.J.H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environ. Poll* . **13**, 281-317.

Phillips, D.J.H., P.S. Rainbow. 1988. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements: a comparative study. *Mar. Ecol. Prog. Ser* . **49**, 83-93.

Pickering, Q., C. Henderson. 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fish. *Int. J. Air Water Pollution* **10**, 453-463.

Pihan, J.C., C. Crochard. 1978. Intèret de l'étude histopathologique de certains organismes cibles dulceaquicoles, en vue d'une meilleure connaissance à la presence de micropolluants. *Bull. Soc. Zool.* **103** (3), 275-283.

Piscator, M. 1979. *Handbook on the toxicology of metals* , edited by L. Friberg et al. Elsevier North- Holland Biomedical Press. 411-420.

Popkova, T.I., I.S. Schelkunov. 1978. Isolation of a virus from carp afflicted with gill necrosis (in Russian). *Rybnoe Khozyaistvo* , **4**, 34-38.

- Potts, W.T., W.R. Fleming.** 1971. The effects of environmental calcium and ovine prolactin on sodium balance in *Fundulus kansae* . *J. Exp. Biol* . **55**, 63-76.
- Probst, G.S.** 1979. Adsorption, distribution, and excretion. Pages 40-59 in H. Menear, ed. Cadmium toxicity. Marcel Dekker, New York.
- Rai, L.C., J.P. Gaur, H.D. Kumar.** 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev* . **36**, 99-151.
- Ramade, F.** 1977. Ecotoxicologie. Masson 2^a ed. Paris. 223p.
- Rand, G.M., S.R. Petrocelli.** 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Hemisphere Publishing, Washington, D.C.
- Ray, S.** 1978. Bioaccumulation of lead in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol* . **19**, 631-636.
- Reichert, W.L., D.A. Federighi, D.C. Malins.** 1979. Uptake and metabolism of lead and cadmium in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology* **63**, 229-234.
- Reid, S.D., D.G. McDonald.** 1988. Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **45**, 244-253.
- Reid, S.D., D.G. McDonald.** 1991. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 1061-1068.
- Rizet, M.** 1977. L'étude de la phototoxicité à long term des metaux lourds par leurs effets teratologiques sur quelques espèces de Diatomés Pennales. Société Lyonnaise des eaux et de l'éclairage, 30p.
- Roberts, R.J.** 1979. *Pathologie du Poisson*. Maloine s.a. (ed.) Paris.
- Robinson, G.D., W.A. Dunson, J.E. Wright, G.E. Mamolito.** 1976. Differences in low pH tolerance among strains of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish Biol.* **8**, 5-17.
- Robinson, M.F., J.M. Mckenzie, C.D. Thomson, A.L. Van Rij.** 1973. Copper in *Handbook on the toxicology of metals* , edited by L.Friberg et al., 1979. Elsevier.

Roch M., J.A. McCarter. 1984 a. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - I. Exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology* **77**, 71-75.

Roch M., J.A. McCarter. 1984 b. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - II. Held in a series of contaminated lakes. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology* **77**, 77-82.

Roch, M., J.A. McCarter, A.T. Matheson, M.J.R. Clark, R.W. Olafson. 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell river system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**, 1596-1601.

Roch, M., P. Nooman, J.A. McCarter. 1986. Determination of no effect levels of heavy metals for rainbow trout using hepatic metallothionein. *Water Res.* **20** (6), 771-774.

Rojo, A. 1988. Dicionário enciclopédico de anatomia dos pees. Monografia Inst. Esp. Oceanogr. 3. Madrid.

Rubi, S.M., J. Aczel, G.R. Craig. 1978. The effects of depressed pH on spermatogenesis in flagfish, *Jordane floridae*. *Water Res.* **12**, 621-626.

Sacadura, M.G. 1980. Carpicultura: algumas considerações sobre as técnicas de produção de carpas para repovoamento e para consumo público. Relatório de actividades do curso de engenheiro silvicultor, apresentado à Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.

Scaife, J.E. 1957. The solubility of malachite. *Can. J. Chem.* **35**, 1332-1340.

Scarfe, A.D., K.A. Jones, C.W. Steele, H. Kleerekoper, M. Corbett. 1982. Locomotor behavior of four marine teleosts in response to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* **2**, 335-353.

Schalscha, E.B., M. Morales, I. Vergara, A.C. Chang. 1982. Chemical fractionation of heavy metals in waste water-affected soils. *J. Water Pollut. Control. Fed.* **54**, 175-185.

- Schaperclaus, W.** 1962. *Traité de pisciculture en étang* . Trad. francesa de Maurice et André Appert - 2^a Ed. Vigot Frères Editeurs, Paris.
- Segner, H.** 1987. Response of fed and starved roach, *Rutilus rutilus*, to sublethal copper contamination. *J. Fish. Biol.* **30**, 423-437.
- Shaikh, Z.A., K. Hirayama.** 1979. Metallthionein in the extracellular fluids as an index of cadmium toxicity. *Environmental Health Perspectives* **28**, 267-271.
- Shaw, T.L., V.M. Brown.** 1974. The toxicity of some forms of copper to rainbow trout. *Water Res.* **8**, 377-382.
- Shrivastava, R.S., P. Dwivedi.** 1979. Studies on the effects of acidic medium on the fry of *Cyprinus carpio* . *Acta Hydrochem. Hidrobiol.* **7**, 421-430.
- Simkiss K., M. Taylor, A.Z. Mason.** 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Marine Biology Letters* **3**, 187-201.
- Simões, J.S.** 1980. I Congresso Nacional de Fitiatría e Fitofarmacologia.
- Smith, L.L., S.J. Broderius, D.M. Oseid, G.L. Kimball, W.H. Koenst.** 1978. Acute toxicity of hydrogen cyanide to freshwater fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **7**, 325-337.
- Snoeyink, V.L., D. Jenkins.** 1980. *Water chemistry* . John Wiley e Sons, New York.
- Solbé, J.F., V.A. Cooper.** 1976. Studies on the toxicity of copper sulphate to stone loach *Naemacheilus barbatulus* in hard water. *Water Res.*, **10** (6), 523-527.
- Spear, P.A., R.C. Pierce.** 1979. Copper in the aquatic environment: chemistry, distribution and technology. Natural Resource Council of Canadian Publication. No 16454, Ottawa, Canadá.
- Sprague, J.B.** 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.* **3**, 793-821.
- Sprague, J.B.** 1970. The measurements of pollutant toxicity to fish. II - Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* **4**, 3-32.
- Sprague, J.B.** 1971. The measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res.* **5**, 245-266.

Sprague, J.B. 1985. Factors that modify toxicity. Pages 124-163 in G.M. Rand and S.R. Petrocelli, ed. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications* . Hemisphere Publishing, Washington, D.C.

Stackhouse, R.A., W.H. Benson. 1989. The effect of humic acid on the toxicity and bioavailability of trivalent chromium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **17**, 105-111.

Steele, C.W. 1983 a. Effects of exposure to sublethal copper on the locomotor behavior of the sea catfish, *Arius felis*. *Aquat. Toxicol.* **4**, 83-93.

Steele, C.W. 1985 a. Latent behavioural toxicity of copper to sea catfish, *Arius felis*, and sheepshead, *Archosargus probatocephalus* . *J. Fish Biol.* **27**, 643-654.

Steinnes, E. 1990. Lead, cadmium, and other metals in scandinavian surface and drinking waters, with emphasis on acidification and atmospheric deposition. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 825-831.

Stiff, M.J. 1971. Copper/bicarbonate equilibria in solutions of bicarbonate ion at concentrations similar to those found in natural water. *Water Res.* **5**, 171-176.

Stokes, P.M. 1979. Copper accumulations in freshwater biota. in *Copper in the environment. Parte I. Ecological Cycling* (J.O. Nriagu Ed), 358-379. John Wiley & Sons. New York.

Stumm, W., J.J. Morgan. 1981. *Aquatic chemistry - An introduction emphasizing chemical equilibrio in natural waters* , 2nd Ed. John Wiley e Sons, New York.

Sunda, W.G., J.A.M. Lewis. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri* *Limnol. Oceanogr.* **23** (5), 870-876.

Taylor, L.T., D.W., Hanser, A.M. Squires. 1981. Organically bound metals in a solvent-refined coal: metallograms for a wyoming subbituminous coal. *Science* **213**, 644-646.

Taylor, R.W., D.R., Duseja, P.R. Thangadu. 1982. Sewage sludge effects on soil: Heavy metal accumulation and movement. *J. Environ. Sci. Health A* **17**, 427-441.

Thornton, I. 1979. Copper in soil and sediments. in *Copper in the Environment. Part I: Ecological Cycling* (J.O. Nriagu, Ed.), 171-216. John Wiley & Sons. New York.

Timmermans, J.A. 1989. Données sur la croissance de quelques espèces de poissons dans des étangs de campine. Station de Recherches Forestiers et Hydrobiologiques. travaux-serie D. n° 56.

Tsai C., J.A. McKee. 1980. Acute toxicity to goldfish (*Carassius auratus*) of mixture of chloramines, copper and linear alkylate sulfonate. *Trans. Am. Fish Soc.* **109**, 132-138.

Tsai, C., K. Chang. 1984. Intraspecific variation in copper susceptibility of the bluegill sunfish. *Arc. Environ. Contam. Toxicol.* **13**, 93-99.

Tsai, C.F., K.Y. Chang. 1981. Effect of sex and size on copper susceptibility of the common guppy, *Lebistes reticulatus* (Peter). *J. Fish Biol.* **19**, 683-689.

Ultsch, G.R., G.Gros. 1979. Mucus as a diffusion barrier to oxygen: possible role in oxygen uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio*) gills. *Comp. Biochem. Physiol.* **62 A**, 685-689.

USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). 1980. Proposed environmental standards and proposed good laboratory practice standards for physical, chemical, persistence, and ecological effects testing. Fed Regist 45, 77332-77365.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1985 b. Ambient water quality criteria for copper - 1984. USEPA, PB85-227023, Washington, D.C.

Van Hoof, F., M. Van San. 1981. Analysis of copper, zinc, cadmium and chromium in fish tissues. A tool for detecting metal caused fish kills. *Chemosphere* **10**, 1127-1132.

Viarengo, A, M.N. Moore, G. Mancinelli, A. Mazzucotelli, R.K. Pipe, S.U. Ferrar. 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology*, **94** (2), 251-257.

- Villegas-Navarro, A., C.M. Villarreal-Treviño.** 1989. Differential uptake of zinc, copper and lead in Texas cichlid (*Cichlasoma cyanoguttatum*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 761-768.
- Waiwod, K.G.** 1977. Effects of copper, hardness and pH on swimming performance and growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Ph.D. Thesis, University of Guelph, Canada.
- Waiwood, K.G., F.W.H. Beamish.** 1978. The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* **13**, 591-598.
- Warner, R.E.** 1967. Bio-assays for microchemical environmental contaminants. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **36**, 181-207.
- Water Quality Criteria.** 1973. EPA, R3-73-033. 594., Washington, D.C.
- Watton, A.J., H.A. Hawkes.** 1984. Studies on the effects of sewage effluent on gastropod populations in experimental streams. *Water Res.* **18**, 1235-1248.
- Whitton, B.A., F.H.A. Sheata.** 1982. Influence of cobalt, nickel, copper, and cadmium on the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Environ. Pollut. Ser. A* **27**, 275-281.
- Williams, R.J.R.** 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **B 294**, 57-74.
- Winner, J.G., Jr. J.P. Giesy.** 1979. Concentrations of Cd, Cu, Mn, Pb and Zn in fishes in a highly organic soft water pond. *J. Fish Res. Bd Can.* **36**, 270-279.
- Winner, R.W.** 1984. The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquat. Toxicol.* **5**, 267-274.
- World Health Organization.** 1980. Recommended health based limits in occupational exposure to heavy metals. WHO. Technical Reports Series No. 647. Genève, Switzerland.
- Young, L.B., H.H. Harvey.** 1989. Concentrations and distribution of Fe, Zn and Cu in tissues of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in relation to elevated levels of metals and low pH. *Hydrobiologia* **176/177**, 349-354.

Young, R.G., D.J. Lisk. 1972. Effect of copper and silver ions on algae. *J. Water Poll. Con. Fed.*, **44** (8), 1643-1647.

Zamuda, C.D., W.C. Sunda. 1982. Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation. *Mar. Biol.* **66**, 77-82.

Zitko, V., W.G. Carson. 1976. A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. *Chemosphere* **5**, 299-303.

ANEXOS

G/SA/SP-1984-08-21
ET 0400500

ANEXO I
T 95 C - doc 54
AOUT 1984

NORME FRANCAISE HOMOLOGUEE

T 90-305

T1 ESSAIS DES EAUX

T2 DETERMINATION DE LA TOXICITE AIGUE D'UNE SUBSTANCE VIS-A-VIS DE
SALMO GAIRDNERI

T3 METHODES SANS RENOUVELLEMENT ET AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU DU
MILIEU

Testing water - Determination of the acute toxicity of a substance
to Salmo Gairdneri - Static and flow through methods

(Remplace T 95 C - doc 38)

AVANT PROPOS

La présente norme française a été élaborée par le comité d'étude de l'AFNOR "Eaux - Toxicité poissons".

Les travaux en cours au sein du comité technique ISO/TC 147 "Qualité de l'eau" sur la toxicité des produits chimiques vis-à-vis des poissons d'eau douce portent sur *Brachydanio rerio* (poisson zèbre).

Pour ce poisson, une norme internationale (actuellement au stade ISO/DIS 7346 - parties 1, 2 et 3), à laquelle correspond, tout en présentant quelques écarts techniques, la norme française NF T 90-303 (..... 19..) doit être prochainement publiée.

Il n'y a pas actuellement à l'ISO de travaux en cours dans le but d'élaborer une méthode d'essai s'appliquant à *Salmo gairdneri* (truite arc-en-ciel).

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme décrit les méthodes suivantes permettant de déterminer la toxicité aigüe d'une substance soluble dans l'eau vis-à-vis d'un poisson d'eau douce, *Salmo gairdneri* (désigné par le nom commun de truite arc-en-ciel) :

- Méthode sans renouvellement du milieu (désignée aussi par essai statique) (voir chapitre 6 - Méthode A)
- Méthode avec renouvellement continu du milieu (voir chapitre 7 - Méthode C).

L'annexe A décrit une méthode avec renouvellement périodique du milieu (désignée aussi par essai semi-statique) pouvant être mise en oeuvre comme une variante de la méthode avec renouvellement continu.

2 PRINCIPE

Détermination, dans des conditions définies par la présente norme, des concentrations initiales auxquelles une substance est létale pour 50 % des *Salmo gairdneri* mis en expérimentation après :

- 24 h pour la méthode A,
- 24 h, 48 h, 72 h et 96 h pour la méthode B.

Ces conditions dites concentrations initiales létales sont désignées respectivement par : CL (I) 50 - 24 h, CL (I) 50 - 48 h, CL (I) 50 - 72 h et CL (I) 50 - 96 h.

L'essai est conduit en deux étapes :

- Un essai préliminaire qui donne une indication approximative de la CL (I) 50 - 24 h et sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif,
- Un essai définitif dont seuls les résultats sont retenus.

3 REACTIFS

Tous les réactifs chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée pour la préparation des solutions doit être distillée dans un appareil en verre ou déionisée de pureté équivalente.

3.1 Réactif biologique

Salmo gairdneri, Richardson (Teleostei, salmonidae), communément appelée truite arc-en-ciel, d'une longueur de 6,0 cm + 1 cm sélectionnées à partir d'un lot unique. Ce lot doit être maintenu durant les deux semaines précédant l'essai, dans une eau de qualité piscicole reconnue d'une dureté calcique d'environ 250 mg/l (exprimée en CaCO_3), aérée de manière continue, dans des conditions de température et d'éclairement semblables à celles de l'essai.

Les poissons doivent être nourris normalement excepté pendant la période de 24 h précédant la mise en route de l'essai. Ils doivent être exempts de maladie ou de malformations apparentes.

3.2 Eau de dilution

3.2.1 Préparation des solutions constitutantes

Solution n° 1

Dissoudre 11,76 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau et diluer à 1 l.

Solution n° 2

Dissoudre 4,93 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau et diluer à 1 l.

Solution n° 3

Dissoudre 2,59 g d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) dans de l'eau et diluer à 1 l.

Solution n° 4

Dissoudre 0,23 g de chlorure de potassium (KCl) dans de l'eau et diluer à 1 l.

3.2.2 Préparation de l'eau de dilution

Mélanger 25 ml de chacune des solutions, n° 1 à n° 4 et compléter à 1 l avec de l'eau.

Cette eau doit avoir un pH de $7,8 \pm 0,2$ et une dureté calcique d'environ 250 mg/l exprimée en carbonate de calcium. Elle doit être aérée avant utilisation de façon à obtenir une concentration en oxygène dissous supérieure ou égale à 90 % de la saturation et jusqu'à stabilisation du pH.

Si nécessaire, ajuster le pH de l'eau ainsi préparée avec une solution diluée d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique.

3.3 Solution mère de la substance à expérimenter

La solution mère de la substance à expérimenter doit être préparée le jour de l'emploi (à moins que la stabilité de la substance en solution dans l'eau soit reconnue) par dissolution d'une quantité connue de substance dans un volume défini d'eau de dilution (3.2.2).

3.4 Solutions d'essais

Les solutions d'essais sont préparées par dilution de la solution mère (3.3) avec de l'eau de dilution (3.2.2) afin d'obtenir les concentrations nécessaires.

3.5 Substance de référence

Dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) de qualité analytique reconnue.

4 APPAREILLAGE

Tout matériau susceptible d'entrer en contact avec le milieu d'essai et les poissons pour essai, doit être inerte et ne doit pas adsorber significativement la substance à expérimenter.

Matériel courant de laboratoire et :

4.1 Récipients pour essai

4.1.1 Méthode A (chapitre 6)

Récipients en verre de capacité suffisante, offrant une grande interface entre l'air et le milieu d'essai (des aquariums parallélépipédiques de 20 l conviennent).

4.1.2 Méthode B (chapitre 7)

Récipients en verre de capacité de 4 à 6 l. Des ballons à fond rond, à deux tubulures et munis de joints en verre rodé, conviennent. Un système de récipients à trop plein non ferrés peut être aussi utilisé.

Avant emploi, les récipients doivent être soigneusement rincés, successivement avec de l'eau et de l'eau de dilution (3.2). Après l'essai, ils doivent être soigneusement lavés par des moyens appropriés pour éliminer toute trace de la substance expérimentée.

4.2 Dispositif de régulation de la température des solutions d'essai et de l'eau des récipients de stockage des poissons à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

4.3 Dispositif de renouvellement continu des solutions (méthode E) permettant de maintenir les concentrations désirées à $\pm 10\%$ et installé de façon à renouveler les solutions d'essai dans les récipients à un taux suffisant pour maintenir la concentration en oxygène dissous au-dessus de 6 mg/l.

5 ENVIRONNEMENT DE L'ESSAI

La préparation et la conservation des solutions, le stockage des poissons et l'ensemble des manipulations et des essais doivent être réalisés dans un local dont l'atmosphère est exempte de poussières et de vapeurs toxiques à des concentrations nocives.

Eviter soigneusement toute perturbation susceptible de modifier le comportement des poissons. Les essais doivent être réalisés sous un éclairage normal de laboratoire avec un photopériodisme de 12 à 16 h d'éclairage.

6 METHODE A : METHODE SANS RENOUVELLEMENT DU MILIEU (essai statique)

6.1 Contrôle de la sensibilité du réactif biologique

De façon à contrôler le réactif biologique, déterminer parallèlement à l'essai, selon la méthode décrite dans le présent chapitre, la CL (I) 50 - 24 h du dichromate de potassium (3.5). La CL (I) 50 - 24 h du dichromate de potassium dilué dans l'eau de dilution doit se situer entre 250 et 450 mg/l.

6.2 Essai préliminaire

Aérer si nécessaire l'eau de dilution pour que la concentration en oxygène dissous atteigne au moins 90 % de la saturation.

Préparer à partir de la solution mère de la substance à expérimenter (3.3) 5 solutions d'essais (3.4) de façon à couvrir une gamme de concentrations adéquate, par exemple 1000 - 100 - 10 - 1 et 0,1 mg/l.

Disposer de 6 récipients d'essai (4.1.1). Introduire dans 5 récipients 10 l de chacune des solutions d'essai et dans l'un 10 l d'eau de dilution (3.2) (récipient témoin).

Réguler la température à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ajouter 5 poissons dans chaque récipient.

Après 24 h, noter le nombre de poissons morts et mesurer la concentration en oxygène dissous dans chaque récipient.

Déterminer l'intervalle de concentrations qui fait varier le pourcentage de mortalité de 0 à 100 %. Si les résultats sont insuffisants pour établir la gamme de concentrations nécessaires à la réalisation de l'essai définitif, répéter l'essai préliminaire avec une autre gamme de concentrations.

6.3 Essai définitif

Aérer si nécessaire l'eau de dilution pour que la concentration en oxygène dissous atteigne au moins 90 % de la saturation.

Préparer des solutions d'essai (3.4) à partir de la solution mère de la substance à expérimenter (3.3) afin d'obtenir une gamme d'au moins 5 concentrations, généralement en progression géométrique (par exemple 8 - 4 - 2 - 1 et 0,5 mg/l), permettant :

- D'inclure de part et d'autre l'intervalle des concentrations qui dans l'essai préliminaire fait varier le pourcentage de mortalité de 0 à 100 %,

- D'obtenir au moins 3 concentrations pour lesquelles le pourcentage de mortalité est compris entre 10 et 90 %.

Disposer de 15 récipients d'essai (4.1.1) (3 récipients par concentrations et 3 récipients témoins). Introduire dans 12 des récipients d'essais de 10 l de solutions d'essai et dans les 3 restants 10 l d'eau de dilution (3.2) (récipients témoins).

Réguler la température à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ajouter 5 poissons dans chaque récipient, choisis au hasard au sein de la population mère, à l'aide d'une épuisette à petite maille. Pour un essai donné, tous les poissons doivent être introduits dans les récipients en moins de 30 min.

Noter après 24 h le nombre de poissons morts dans chaque récipient d'essai.

Mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température dans chaque récipient au début et à la fin de l'essai.

Noter tout comportement anormal des poissons.

7 METHODE B : METHODE AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU DU MILIEU

7.1 Contrôle de la sensibilité du réactif biologique

De façon à contrôler le réactif biologique, effectuer, parallèlement à l'essai, un essai avec le dichromate de potassium (3.5) selon la méthode A (chapitre 6). La CL (I) 50 - 24 h du dichromate de potassium dilué dans l'eau de dilution, doit se situer entre 250 et 450 mg/l.

7.2 Essai préliminaire

La méthode avec renouvellement continu doit être utilisée pour l'essai préliminaire.

A partir de la solution mère de la substance à expérimenter (3.3) préparer des solutions d'essai par dilution avec de l'eau de dilution préalablement aérée de façon à obtenir une gamme de concentrations adéquate, par exemple 1000 - 100 - 10 - 1 et 0,1 mg/l.

Disposer de 6 récipients d'essai. Introduire dans 5 récipients 4 l de chacune des solutions d'essai et dans l'un, 4 l d'eau de dilution (3.2) (récipient témoin).

Réguler la température à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ajouter 5 poissons dans chaque récipient. Mettre en marche le système de renouvellement continu au débit voulu (voir 7.3).

Au moins une fois par jour, pendant la durée de l'essai, noter le nombre de poissons morts et mesurer la concentration en oxygène dissous dans chaque récipient. Retirer les poissons morts.

Déterminer l'intervalle de concentrations qui fait varier le pourcentage de mortalité de 0 à 100 %. Si les résultats sont insuffisants pour établir la gamme de concentrations nécessaires à la réalisation de l'essai définitif, répéter l'essai préliminaire avec une autre gamme de concentrations.

7.3 Essai définitif

Préparer des solutions d'essai (3.4) à partir de la solution mère de la substance à expérimenter (3.3) afin d'obtenir une gamme d'au moins 5 concentrations, généralement en progression géométrique (par exemple 8 - 4 - 2 - 1 et 0,5 mg/l), permettant :

- D'inclure de part et d'autre l'intervalle des concentrations qui dans l'essai préliminaire fait varier le pourcentage de mortalité de 0 à 100 %,

- D'obtenir au moins 3 concentrations pour lesquelles le pourcentage de mortalité est compris entre 10 et 90 %.

Disposer de 15 récipients d'essai (4.1.2) (3 récipients par concentrations et 3 récipients témoins). Introduire dans 10 récipients 4 l de solutions d'essai et dans les 3 restants 4 l d'eau de dilution (3.2) (récipients témoins).

Réguler la température à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ajouter 5 poissons dans chacun des récipients, choisis au hasard au sein de la population mère, à l'aide d'une épuisette à petite maille. Pour un essai donné, tous les poissons doivent être introduits dans les récipients en moins de 30 min.

Régler le dispositif de renouvellement des solutions (4.3) à un débit d'au moins 50 l par jour soit en continu, soit par addition à de courts intervalles. La concentration en oxygène-dissous des solutions évacuées doit rester supérieure à 6 mg/l. Les solutions d'essai utilisées pour le renouvellement doivent être thermostatées à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ avant d'être introduites dans les récipients d'essais.

Noter après 24 h, 48 h, 72 h et 96 h, selon la durée de l'essai, et au moins deux fois par jour pendant la durée de l'essai, le nombre de poissons morts dans chaque récipient et les retirer aussitôt que possible.

Mesurer la concentration en oxygène dissous dans les solutions évacuées de chaque récipient, le pH et la température au moins une fois par jour, au début et à la fin de l'essai.

Noter tout comportement anormal des poissons.

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Validité de l'essai

Les résultats sont considérés comme valables si les conditions suivantes sont respectées :

- a) La concentration en oxygène dissous mesurée dans les solutions d'essai à la fin de l'essai, est égale au moins à 6 mg/l,

- b) La mortalité des poissons des récipients témoins n'excède pas 10 %,

- c) La CL (I) 50 - 24 h du dichromate de potassium se situe entre 250 et 450 mg/l.

8.2 Estimation de la CL (I) 50

A la fin de l'essai définitif, calculer pour chaque concentration testée le pourcentage de mortalité P.

Déterminer la CL (I) 50 (24 h pour la méthode A, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h pour la méthode B selon la durée de l'essai) en établissant un diagramme gauss-logarithmique ⁽¹⁾ (voir figures en Annexe E) en portant en ordonnées les pourcentages de mortalité P et en abscisses les concentrations correspondantes.

Tracer au mieux la droite de régression à partir des points pour lesquels les pourcentages sont compris entre 10 et 90 % et en déduire la CL (I) 50 de la substance.

La méthode de Litchfield et Wilcoxon ⁽²⁾ ou l'analyse de probits ⁽³⁾ peuvent être également utilisées pour calculer la CL (I) 50 et sa limite de confiance à 95 %.

Si une détermination de la CL (I) 50 ne peut être raisonnablement obtenue, en rechercher les causes et recommencer l'essai en diminuant par exemple la raison de la progression géométrique choisie pour la gamme de concentration.

S'il demeure impossible de déterminer la CL (I) 50, indiquer la concentration maximale utilisée correspondant à 0 % de mortalité et la concentration minimale utilisée correspondant à 100 % de mortalité.

(1) Echelle logarithmique de base 10 en abscisse, échelle gaussienne de 1 à 99 % en ordonnée.

(2) Litchfield J.F. and Wilcoxon F. A simplified Method of evaluating dose effect experiments. J. Pharmac exp. Ther 96, pp 99 - 113 - 1949.

(3) Finney, D. S. Probits analysis. Cambridge University , 1971.

9. PROCES VERBAL D'ESSAI

Le procès verbal d'essai doit comporter les indications suivantes :

- Toutes les données nécessaires à l'identification de la substance expérimentée,
- Toutes les informations nécessaires concernant le réactif biologique,
- La méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai,
- La description du dispositif de renouvellement des solutions (pour la méthode B),
- Les données prises en compte pour établir la validité de l'essai :
 - . concentration en oxygène dissous en fin d'essai,
 - . mortalité observée pour les témoins,
 - . CL (I) 50 - 24 h du dichromate de potassium et ses limites de confiance à 95 %,
- Le pH des solutions en début et en fin d'essai,
- Un tableau indiquant les concentrations expérimentées et les pourcentages de mortalité à 24 h, 48 h, 72 h et 96 h (selon le type et la durée de l'essai) (voir exemple de présentation des résultats en Annexe C)),
- Les valeurs de la CL (I) 50 exprimées en milligrammes par litre de la substance expérimentée, la méthode selon laquelle elles ont été calculées, les limites de confiance à 95 % et les courbes concentration-réponse,
- La concentration minimale correspondant à 100 % de mortalité et la concentration maximale correspondant à 0 % de mortalité,
- Toute information concernant les modifications du comportement des poissons pendant l'essai,
- Tout détail opératoire non prévu dans la présente norme ainsi que les incidents susceptibles d'avoir agi sur les résultats,
- La référence à la présente norme en précisant la méthode utilisée (méthode A ou B).

Méthode avec renouvellement périodique du milieu

(essai semi-statique)

A.1 Contrôle de la sensibilité du réactif biologique

Voir paragraphe 6.1.

A.2 Essai préliminaire

Voir paragraphe 6.2

A.3 Essai définitif

Aérer si nécessaire l'eau de dilution pour que la concentration en oxygène dissous atteigne au moins 90 % de la saturation.

Préparer des solutions d'essai (3.4) à partir de la solution mère de la substance à expérimenter (3.3) afin d'obtenir une gamme d'au moins 5 concentrations, généralement en progression géométrique (par exemple 8 - 4 - 2 - 1 et 0,5 mg/l), permettant :

- D'inclure de part et d'autre l'intervalle des concentrations qui dans l'essai préliminaire fait varier le pourcentage de mortalité de 0 à 100 %,

- D'obtenir au moins 3 concentrations pour lesquelles le pourcentage de mortalité est compris entre 10 et 90 %.

Disposer de 15 récipients d'essai (4.1.1) (3 récipients par concentration et 3 récipients témoins). Introduire dans 12 des récipients 10 l de solutions d'essai et dans les 3 restants 10 l d'eau de dilution (3.2) (récipients témoins).

Réguler la température à $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Ajouter 5 poissons dans chaque récipients choisis au hasard au sein de la population mère, à l'aide d'une épuisette à petite maille. Pour un essai donné, tous les poissons doivent être introduits dans les récipients en moins de 30 min.

Toutes les 24 h, pendant la durée de l'essai, préparer de nouvelles solutions d'essai dans de nouveaux récipients et y transférer les poissons vivants. Dans le but d'éviter un transfert significatif de la substance expérimentée entre les récipients par l'intermédiaire de l'épuisette, le transfert des poissons doit être effectué par ordre des concentrations croissantes.

Les solutions ne doivent pas être vigoureusement aérées.

Noter au moins après 24 h, 48 h, 72 et 96 h, selon la durée de l'essai, le nombre de poissons morts dans chaque récipient d'essai et les retirer aussitôt que possible.

Mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température dans chaque récipient au moins au début de l'essai, avant et après le renouvellement des solutions et à la fin de l'essai.

Noter tout comportement anormal des poissons.

Poursuivre comme indiqué au chapitre 8.

ANALISE DA ÁGUA DA PISCICULTURA (AZAMBUJA)**Caracteres organoléticos**

Aspecto..... Límpido com raras substâncias em suspensão
Côr..... Incolor
Cheiro Inodora
Alteração com o tempo..... Formação de ligeiro depósito

Análise química

pH a 20°C 7,65±0,20
Resíduo seco a 105°C..... 570±20 mg.l⁻¹
Dureza total (CaCO₃)..... 301,2±8,6 mg.l⁻¹
Alcalinidade total (CaCO₃)..... 223,2±12,3 mg.l⁻¹
Cloretos (Cl⁻) 152,6±5,4 mg.l⁻¹
Oxidabilidade (KMnO₄ em meio ácido) 0,44±0,07 mg.l⁻¹

Pesquisa de:

Nitritos Negativa
Nitratos Vestígios (< 5 mg.l⁻¹)
Amónio (NH₄) Negativa
Ferro (Fe⁺⁺)..... 0,02 mg.l⁻¹
Cobre (Cu²⁺) Negativa
Sulfatos (SO₄²⁻)..... 33±2 mg.l⁻¹

Dureza 50

Dose	effectif
50	10
75	10
100	10
125	10
150	10

Nombre d'ajustements = 1

Pente = 6.7658

Décalage = -14.1233

Ecart-type = .1478

D.E. 50 = 122.314

X^2 = 1.06

$\log(D.E. 50) = 2.08748$

d.d.l. = 3

Intervalle de confiance à 95 % : +/- .066

$p(X^2)$ = .7867

lim. inf. = 104.99

lim. sup. = 142.498

Nombre d'ajustements = 2

Pente = 6.9055

Décalage = -14.5724

Ecart-type = .1448

D.E. 50 = 128.91

X^2 = 2.297

$\log(D.E. 50) = 2.11029$

d.d.l. = 3

Intervalle de confiance à 95 % : +/- .069

$p(X^2)$ = .5131001

lim. inf. = 109.887

lim. sup. = 151.226

Nombre d'ajustements = 2

Pente = 6.2507

Décalage = -12.8331

Ecart-type = .16

D.E. 50 = 113.004

X^2 = .764

$\log(D.E. 50) = 2.05309$

d.d.l. = 3

Intervalle de confiance à 95 % : +/- .067

$p(X^2)$ = .858

lim. inf. = 96.792

lim. sup. = 131.931

Nombre d'ajustements = 3

Pente = 7.993

Décalage = -16.117

Ecart-type = .1251

D.E. 50 = 103.851

X^2 = 2.729

$\log(D.E. 50) = 2.01641$

d.d.l. = 3

Intervalle de confiance à 95 % : +/- .056

$p(X^2)$ = .4353

lim. inf. = 91.392

lim. sup. = 118.009

Nombre d'ajustements = 3
 Pente = 7.1177
 Décalage = -14.3393
 Ecart-type = .1405 D.E. 50 = 103.421
 log (D.E. 50) = 2.01461
 χ^2 = 4.733 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .06
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 90.079
 p(χ^2) = .1924 lim. sup. = 118.739

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 6.112
 Décalage = -12.4803
 Ecart-type = .1636 D.E. 50 = 110.138
 log (D.E. 50) = 2.04194
 χ^2 = .391 Intervalle de confiance à 95 % : +/- 6.800001
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 94.221 E-02
 p(χ^2) = .942 lim. sup. = 128.745

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 5.3975
 Décalage = -10.8949
 Ecart-type = .1853 D.E. 50 = 104.361
 log (D.E. 50) = 2.01854
 χ^2 = 1.06 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .074
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 88.043
 lim. sup. = 123.704

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 6.8086
 Décalage = -13.7437
 Ecart-type = .1469 D.E. 50 = 104.37
 log (D.E. 50) = 2.01858
 χ^2 = 1.071 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .062
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 90.50701
 p(χ^2) = .784 lim. sup. = 120.357

Durezza 100

Dose	effectif
200	10
250	10
300	10
325	10
350	10

```

Nombre d'ajustements = 2
Pente = 11.7063
Décalage = -29.2384
Ecart-type = .0854 D.E. 50 = 314.531
log (D.E. 50 ) = 2.49766
X² = 1.736 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .036
d.d.l. = 3 lim. inf. = 289.566
p(X²) = .6289 lim. sup. = 341.649

```

```

Nombre d'ajustements = 3
Pente = 15.4899
Décalage = -38.3193
Ecart-type = .0646
D.E. 50 = 297.733
log (D.E. 50 ) = 2.47383
Intervalle de confiance à 95 % : +/- .029
X² = 3.567
lim. inf. = 278.803
lim. sup. = 317.948
d.d.l. = 3
p(X²) = .3121

```

```

Nombre d'ajustements = 2
Pente = 11.891
Décalage = -28.9318
Ecart-type = .0841
D.E. 50 = 271.08
X² = 1.932 log (D.E. 50 ) = 2.4331
d.d.l. = 3 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .036
p(X²) = .5866 lim. inf. = 249.323
lim. sup. = 294.735

```

```

Nombre d'ajustements = 2
Pente = 11.1083
Décalage = -27.1965
Ecart-type = 9.000001
D.E. 50 = 280.748
X² = 1.499 log (D.E. 50 ) = 2.44832
d.d.l. = 3 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .037
p(X²) = .6825 lim. inf. = 257.944
lim. sup. = 305.569

```

Nombre d'ajustements = 1
 Pente = 8.980799
 Décalage = -21.6713
 Ecart-type = .1113 D.E. 50 = 258.867
 log (D.E. 50) = 2.41308
 X^2 = 1.439 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .047
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 232.561
 $p(X^2)$ = .6964 lim. sup. = 288.149

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 12.1625
 Décalage = -30.1602
 Ecart-type = .0822 D.E. 50 = 297.733
 log (D.E. 50) = 2.47383
 X^2 = .41 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .029
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 278.803
 $p(X^2)$ = .9381 lim. sup. = 317.948

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 15.7871
 Décalage = -38.6204
 Ecart-type = .0633 D.E. 50 = 279.467
 log (D.E. 50) = 2.44633
 X^2 = 1.623 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .03
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 260.818
 $p(X^2)$ = .6541 lim. sup. = 299.449

Nombre d'ajustements = 1
 Pente = 8.8652
 Décalage = -21.602
 Ecart-type = .1128 D.E. 50 = 273.362
 log (D.E. 50) = 2.43674
 X^2 = .349 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .044
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 246.838
 $p(X^2)$ = .9505 lim. sup. = 302.737

Dureza 300

Dose	effectif
800	10
825	10
850	10
875	10
900	10

Nombre d'ajustements = 4
 Pente = 68.7805
 Décalage = -201.2949
 Ecart-type = .0145 D.E. 50 = 844.559
 log (D.E. 50) = 2.92663
 X^2 = 2.595 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .006
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 832.162
 $p(X^2)$ = .4583 lim. sup. = 857.141

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 65.031
 Décalage = -190.3455
 Ecart-type = .0154 D.E. 50 = 845.273
 log (D.E. 50) = 2.927
 X^2 = 2.325 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .007
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 832.38
 $p(X^2)$ = .5077001 lim. sup. = 858.365

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 43.1431
 Décalage = -124.1019
 Ecart-type = .0232 D.E. 50 = 752.52
 log (D.E. 50) = 2.87652
 X^2 = 2.988 Intervalle de confiance à 95 % : +/- 8.99999
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 736.754
 $p(X^2)$ = .3934 lim. sup. = 768.623

Nombre d'ajustements = 3
 Pente = 55.5309
 Décalage = -159.7942
 Ecart-type = .018 D.E. 50 = 754.356
 log (D.E. 50) = 2.87758
 X^2 = 3.573 Intervalle de confiance à 95 % : +/- 8.00000
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 741.106
 $p(X^2)$ = .3114 lim. sup. = 767.842

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 69.7536
 Décalage = -207.4351
 Ecart-type = .0143 D.E. 50 = 941.521
 log (D.E. 50) = 2.97383
 χ^2 = .515 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .006
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 928.27
 $p(\chi^2)$ = .9155 lim. sup. = 954.96

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 66.9537
 Décalage = -199.6816
 Ecart-type = .0149 D.E. 50 = 960.248
 log (D.E. 50) = 2.98238
 χ^2 = .766 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .006
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 946.322
 $p(\chi^2)$ = .8575 lim. sup. = 974.379

Nombre d'ajustements = 1
 Pente = 32.2124
 Décalage = -85.8418
 Ecart-type = .031 D.E. 50 = 462.25
 log (D.E. 50) = 2.66488
 χ^2 = 1.181 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .013
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 448.302
 $p(\chi^2)$ = .7575 lim. sup. = 476.631

Nombre d'ajustements = 2
 Pente = 29.9826
 Décalage = -79.9093
 Ecart-type = .0334 D.E. 50 = 462.586
 log (D.E. 50) = 2.66519
 χ^2 = 1.748 Intervalle de confiance à 95 % : +/- .014
 d.d.l. = 3 lim. inf. = 447.823
 $p(\chi^2)$ = .6263 lim. sup. = 477.836

